

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 1/28, B01L 3/00, B01J 19/00, G01N 30/00, C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/01559 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Januar 1995 (12.01.95)
--	-----------	--

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP94/02173**
 (22) Internationales Anmeldedatum: **2. Juli 1994 (02.07.94)**

(30) Prioritätsdaten:
P 43 22 147.5 2. Juli 1993 (02.07.93) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): **EVOTEC
 BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529
 Hamburg (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EIGEN, Manfred [DE/DE];
 Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). HENCO,
 Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-40699 Erkrath (DE).
 SCHÖBER, Andreas [DE/DE]; Auf der Lieth 36, D-37077
 Göttingen (DE). SCHWIENHORST, Andreas [DE/DE];
 Weender Landstrasse 68, D-37075 Göttingen (DE).
 KÖHLER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 36, D-07743 Jena
 (DE). THÜRK, Marcel [DE/DE]; Greifswalder Strasse 6,
 D-37083 Göttingen (DE). GÜNTHER, Rolf [DE/FR]; 11,
 allée Bernadotte, F-92330 Sceaux (FR). DÖRING, Michael
 [DE/DE]; Hopfenweg 218, D-22851 Norderstedt (DE).**

(74) Anwälte: **HILLERINGMANN, Jochen usw.; Deichmannhaus,
 Bahnhofsvorplatz 1, D-50667 Köln (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten: **JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
 CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
 SE).**

Veröffentlicht

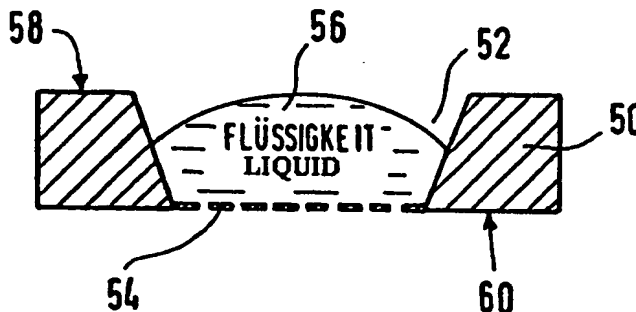
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: **SAMPLE HOLDER AND ITS USE**

(54) Bezeichnung: **PROBENTRÄGER UND SEINE VERWENDUNG**

(57) Abstract

Described is a device designed to hold a multiplicity of chemical and/or biological samples. The device has at least one mechanical micro-sample holder (50) with a lower surface (60) and, remote from it, an upper surface (58), the holder being divided into a multiplicity of recesses (52) with floors, the recesses (52) being produced using non-cutting techniques, in particular by etching. In order to produce apertures extending between the upper and lower surfaces of the sample holder, at least part of the floor (54) of each recess (52) is porous.



(57) Zusammenfassung

Die Vorrichtung zur Aufnahme einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Proben ist mit mindestens einem mikromechanischen Probenträger (50) mit einer Unterseite (60) und einer dieser abgewandten Oberseite (58), in der eine Vielzahl von mit Böden versehenen Ausnehmungen (52) auf nicht-spanende Weise, insbesondere durch Ätzen gebildet sind, versehen. Zur Bildung von sich zwischen der Oberseite und der Unterseite des Probenträgers erstreckenden Durchlässen sind die Böden (54) der Ausnehmungen (52) zumindest teilweise porös.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Probenträger und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Probenträger sowie die Verwendung des Probenträgers in einem Verfahren zur parallelen Führung chemischer und biologischer Reaktionen.

Bei der Suche nach neuen Verbindungen mit gewünschten Funktionen werden vermehrt nicht-rationale Verfahren der Synthese von Leitstrukturen eingesetzt, um zunächst eine große Anzahl verschiedener Strukturen zu synthetisieren. Dies betrifft die Synthese kleiner Moleküle durch chemische oder photosynthetische Verfahren wie auch die Synthese größerer biologischer Moleküle wie Peptide, Proteine, Nukleinsäuren unter Ausnutzung chemischer oder enzymatischer Reaktionsverfahren. Durch die Verfügbarkeit miniaturisierter Analyseverfahren, durch die sich die sogenannte "Fitness" eines Syntheseproduktes bezogen auf eine erwünschte Funktion feststellen bzw. quantitativ messen läßt, ist bereits die Synthese dieser Leitstrukturen im Miniaturmaßstab möglich.

Die Anforderungen gehen dabei deutlich über den mit der Mikrotitrationsplatte bereits erreichbaren Grad der Miniaturisierung und zahlenmäßigen Parallelführung von Reaktionen hinaus. Es wird vielfach angestrebt, mehr als tausend Reaktionen parallel führen zu können. Dafür müssen prinzipiell neue Konzeptionen der Vorrichtung und der Probenhandhabung realisiert werden. Hierzu bedarf es unter anderem eines Mikroreaktionsgefäßes bzw. Reaktionsräumen und einer Vorrichtung, mit der diese Mikroreaktionsräume oder -gefäße beschickt, entleert, zur Analyse und Synthese von Proben vorbereitet usw. werden. Dabei muß gleichzeitig gewährleistet sein, daß die jeweiligen Proben zuverlässig zugeordnet und wiedergefunden werden können. Um die gefor-

- 2 -

dernten Probenzahlen bearbeiten zu können, ist es unbedingt erforderlich, mit entsprechend kleinen Mengen und Volumina zu arbeiten.

In R. Frank, Tetrahedron Vol. 48, 42, 9217-9232, wird ein Verfahren beschrieben, nach dem es möglich ist, auf Cellulosefiltern im Spot-Verfahren Bibliotheken von festphasengekoppelten Peptiden in parallel geführten Synthesen zu erstellen, um sie anschließend einer funktionalen Prüfung zu unterziehen, z.B. der Bindung an einen Antikörper. Vergleichbare Verfahren wurden von Fodor et al. (Science 1991, 251, 767 - 773) und Geysen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 1984, 81, 3998 - 4002) beschrieben. Andere Verfahren werden in einem Review (Fields et al. Int. J. Peptide Protein Res. 1990, 35, 161 - 214) diskutiert. Die Koppelungs-Chemie ist, von Variationen abgesehen, für alle Verfahren im Prinzip vergleichbar und greift auf traditionelle Verfahren bezüglich Lösungsmittel zurück. Vergleichbare Verfahren sind für die Oligonukleotid-Synthese entwickelt worden. Die Verfahren sind für einen 50 nMol-Maßstab ausgelegt. Die Spanne umfaßt einen fmol- bis μ Mol-Bereich. Die einzelnen Pipettierschritte umfassen zwar Volumina von 0,1 - 0,01 μ l, dennoch sind diese Bedingungen noch immer überdimensioniert oder ungeeignet.

Selbst Syntheseraten im fmol-Bereich bedeuten bei einem anschließenden Test in einem Volumen von 10 μ l eine Konzentration von $> 10 \mu$ M, d.h. eine Konzentration, die für hochspezifische und hochaffine Bindungsassays noch zu groß sein kann. Ein weiterer Nachteil ist das Zerfließen der Tropfen. Tropfengrößen von 100 nl auf Whatman 1Chr oder Whatman 3MM generieren Spots von 3 - 4 mm Durchmesser. Bei automatischer Auftragung können kleinere Spots mit einer Dichte von 100 Spots pro cm^2 realisiert werden.

Die Filtertechnologie ist aber problematisch in der Handhabung und Positionierung, wenn noch höhere Spotdichten erzeugt werden sollen. Dann ist auch ein herkömmliches Pipettiersystem ungeeignet und nicht mehr hinreichend präzise, die entsprechenden Positionierungen der Proben reproduzierbar zu bewerkstelligen.

Nachteilig ist auch eine anschließende Bewertung jeder einzelnen Position auf bestimmte Eigenschaften. So ist es häufig wünschenswert, die festphasengekoppelten Syntheseprodukte in ein Reaktionsvolumen in Lösung zu entlassen, da die Festphasenkopplung häufig unerwünschte Effekte in Hinblick auf die zu analysierende Funktion ergibt. Eine Trennung der einzelnen Kompartimente ist aber auf einem flächigen Träger nicht ohne weiteres zu erreichen.

Zur parallelen Führung einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Reaktionen bedarf es eines Probenträgers mit einer Vielzahl von Ausnehmungen (in dieser Beschreibung auch mit Kompartiment bezeichnet) in seiner Oberseite. Hierzu werden zweckmäßigerweise mikromechanisch hergestellte Strukturen verwendet. Ein solcher Probenträger mit mikroskopisch kleinen Ausnehmungen ist aus DE 39 15 920 A1 bekannt. Die Ausnehmungen dieses bekannten Probenträgers weisen einen geschlossenen in der Unterseite des Probenträgers auf.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Probenträger zu schaffen, der eine Vielzahl von zu untersuchenden Proben mit einem Volumen von insbesondere weniger als 10 μ l aufnehmen kann und der zu Synthetisierungs-, Sequenzierungs- und Analysezwecken eingesetzt werden kann.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird mit der Erfindung ein Probenträger vorgeschlagen, der durch die Merkmale des Anspruchs 1 gekennzeichnet ist. Zweckmäßige Ausgestaltungen

Volumen von jeweils weniger als 10 μ l auf, wobei benachbarte Kompartimente bzw. Ausnehmungen voneinander einen Abstand von < 5 mm haben.

Der erfindungsgemäße Probenträger ist geeignet, eine Vielzahl von Proben in paralleler Reaktionsführung chemischer Reaktionen in flüssiger oder heterogener Phase zu bearbeiten. Dadurch werden große Zahlen parallel geführter chemischer und biologischer Reaktionen, insbesondere bei evolutionen Entwicklungsverfahren und Experimenten möglich. Unter paralleler Führung ist eine Prozessierung einer Vielzahl ähnlicher oder gleicher Reaktionstypen oder Arbeitsschritte zu verstehen, wobei die Prozessierung der Reaktionen, die den Reaktionstyp bilden, gleichzeitig oder nacheinander erfolgen kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung macht es möglich, kontaminationsfrei Volumina von \leq 100 μ l abzufüllen und die entsprechend abgelegten Proben zu kennzeichnen und wiederzufinden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung bildet ein universell anwendbares Reaktions- und/oder Analysensystem, wobei die Reaktions- bzw. Analysensysteme miteinander gekoppelt sein können.

Der erfindungsgemäße Probenträger besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einer Schicht eines ätzbaren Materials und weist die Kompartimente als Hohlräume in der Schicht des Materials auf. Die Kompartimente sind befüllbare Hohlräume, die in die Schicht hineinragen. Typischerweise weist ein Kompartiment umschließende Seitenwände und einen Boden auf. Die Kompartimente des Probenträgers sollten dabei vorzugsweise an einer Seite mit der umgebenen Atmosphäre in Stoffaustausch stehen oder mit einer Gasphase und/oder einer für mindestens zwei Kompartimente gleichermaßen zugänglichen flüssigen Phase in molekularem Stoffaustausch stehen. Dazu ist der Boden der Kompartimente durch eine poröse Bodenplatte gebildet.

Der Probenträger nach der Erfindung läßt sich aus den aus der Halbleitertechnik bekannten Materialien, insbesondere durch Ätzen von Silizium, sowie nach den aus der Halbleitertechnik bekannten Verfahren herstellen. Träger mit einer Vielzahl von miniaturisierten Kompartimenten bzw. Reaktionskammern ließen sich prinzipiell auch mit Hilfe der LIGA-Technik herstellen (zum Prinzip dieser Technik siehe z.B. V. Menz, P. Bley; Mikrosystemtechnik für Ingenieure, VCH 1993). Bei dieser Technik wird ein Master durch Röntgentiefenlithografie erzeugt. Nach galvanischer Abformung dieses Masters können dann Tochterelemente gepreßt oder gegossen werden. Dieses Verfahren bietet Kunststoff als Materialalternative zu den oben vorgeschlagenen Siliziumträgern. Die Anfertigung von Mastern wird im allgemeinen an einem Synchrotron-Belichtungsgerät vorgenommen, das relativ teuer ist und derzeit nur an einigen wenigen Forschungseinrichtungen zur Verfügung steht, während die Silizium- und Dünnschichttechnologie kostengünstig und gut eingeführt ist und von zahlreichen Unternehmen und Einrichtungen beherrscht wird. Die Kantenqualität der Mikrostrukturen kann sich durch die Abformprozesse vermindern. Die Integration von Dünnschichtelementen (optische Schichten, Sensoren, Aktoren) ist problematisch, während sie gut in den Rahmen der vorgeschlagenen Kombination aus Siliziumeinkristall- und Dünnschichttechnologie paßt.

Der Arbeitsablauf bei der Herstellung von Si-Kammerträgern gliedert sich wie folgt: Auf der Vorder- und Rückseite der geläpften und polierten Wafer mit einer 100-Orientierung wird ein Mehrschichtsystem bestehend aus je 2 SiO_2 - und Si_3N_4 -Schichten mit Einzelschichtdicken von 0,2 bis 2 μm aufgebracht. Anschließend werden Vorder- und Rückseite des Wafers mit einem Fotolack beschichtet und eine fotolithografische Maske auf den zu strukturierenden Seiten erzeugt. Im Falle der einfachen Kammerträger wird eine Maske

mit quadratischen Fenstern auf nur einer Seite hergestellt, im Falle der Siebboden-Kammern wird auf der den großen Kammeröffnungen gegenüberliegenden Seite eine Maske mit mittig zu den großen Fenstern angeordneten kleinen quadratischen Felder von Porenstrukturen erzeugt. Die Abmessungen der sich gegenüberliegenden Maskenstrukturen sind dabei so bemessen, daß sich auf Grund des kristallografischen Ätzverhaltens des Siliziums und unter Berücksichtigung der Waferdicke eine Kammerform ergibt, die weitgehend einem quadratischen Pyramidenstumpf entspricht. Die Maskenstruktur wird durch sukzessive selektive Ätzprozesse zunächst in die äußere SiO_2 -Schicht, danach in die darunterliegenden Schichten und anschließend in das einkristalline Silizium übertragen (zum mikrolithografischen Silizium-Tiefenätzen siehe DD-PS 300 622).

Im Falle der einfachen Kammerträger kann der Kammerboden entweder nur aus der im sichtbaren Spektralbereich transparenten $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran ($0,8 \mu\text{m}$ dick) oder aus einer mehrere μm dicken Siliziummembran bestehen, die im IR transparent ist. Im Fall der Siebbodenkammern besteht das Bodennetz stets aus der ca. $0,8 \mu\text{m}$ dicken $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Kombinationen von Siebbödenelementen und geschlossen Böden sind möglich.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Wände der Kompartimente mindestens teilweise mit einer Schicht eines inerten Materials versehen. Der Probenträger ist vorzugsweise einer gesättigten Atmosphäre ausgesetzt, um ein Verdampfen der in den Kompartimenten des Probenträgers oder, bei hydrophobem Probenkörper auf dessen Oberfläche befindlichen Lösungen zu vermeiden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wirkt der erfindungsgemäße Probenträger mit einer Einrichtung zur Analyse der Inhalte der Kompartimente zusammen. Die Einrichtung zur

Analyse ist insbesondere ein optisches Detektionssystem. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein CCD-System.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Probenträger ein Wafer, wie er für die Halbleitertechnologie verwendet wird. Die Detektionseinrichtung ist vorzugsweise mit einem Faserbündel (faseroptische Platte) versehen, das die von dem Probenträger kommende optische Information aufnimmt und diese an einen vorzugsweise hochauflösenden CCD-Sensor weiterleitet, wobei für laseroptische Untersuchungen eine Filterschicht wie ein Metallfilm aufgedampft ist. Der Probenträger ist dabei ein eigenständiges Modul oder mit einem Probenträgerhalter fest verbunden. Die modulare Ausführungsform hat den Vorteil, daß die Probenträger schnell auswechselbar sind und sich insbesondere für den Einmalgebrauch eignen. Es ist vorteilhaft die Kompartimente gleich mit einem oder mehreren Lichtleitern auszustatten. Die Kompartimente können mit Meßeinrichtungen wie Temperaturfühler und/oder Sensoren zur pH-Messung oder CO₂-Messung etc. versehen sein, um die Reaktionen mittels bestimmter Parameter zu steuern.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist vorzugsweise pro Position eines Kompartiments mehrere miteinander in Kontakt stehende Kompartimente in einer Anordnung übereinander auf, wobei die Kompartimente jeweils durch poröse Einrichtungen voneinander getrennt sind. Zur Reaktionsführung bei bestimmten Problemstellungen kann es vorteilhaft sein, in den Kompartimente ein chromatographisches Trennmateriale anzuordnen. Die Kompartimente des erfindungsgemäßen Probenträgers lassen sich von mindestens einer Seite aus mit einer (Mikro-)Dosiereinrichtung mit vorbestimmten Lösungsvolumina beladen.

Eine Mikrodosiereinrichtung und/oder der erfindungsgemäße läßt bzw. lassen sich zweidimensional (X/Y-Tisch) mecha-

nisch über einen Rechner steuern, um die relative Positionierung von Probenträger und Mikrodosiereinrichtung zu gewährleisten. Die Mikrodosiereinrichtung weist vorzugsweise eine in ihrem Querschnitt mindestens teilweise durch piezoelektrische Einwirkung veränderbare Kapillare oder eine Vielzahl solcher Kapillaren auf. Dabei wird die Menge der jeweils im Probenträger abzulegenden Lösung, vorzugsweise rechnergesteuert, über piezo-getriggerte Tropfenzahl als ganzzahliges Vielfaches eines Einheitstropfenvolumens in das Kompartiment überführt.

Bei der Durchführung von Reaktionen in den jeweiligen Kompartimenten kann es vorteilhaft sein, dort bereits vorgefertigte Reagenzien anzuordnen.

Der erfindungsgemäße Probenträger läßt sich zur parallelen Führung von Reaktionen und/oder Analysen und/oder chromatographischen Trennungen großer Zahlen voneinander unabhängiger Reaktionsansätze mit dem Ziel der vergleichenden Analyse und/oder Kultivierung vermehrungsfähigen biologischen Materials und/oder der chemischen Synthese verwenden. Vermehrungsfähige biologische Materialien sind dabei insbesondere Viren und/oder Zellen. Es können in den Kompartimenten jedoch auch zellfreie Amplifikationen von Nukleinsäuren (PCR-Reaktionen und ähnliches) durchgeführt werden. Der erfindungsgemäße Probenträger kann aber auch zur Untersuchung der phänotypischen Eigenschaften von Mutanten, die sich jeweils in verschiedenen Kompartimenten befinden oder dort gebildet werden, verwendet werden, insbesondere kann im Hinblick auf spezifische Bindungseigenschaften oder enzymatische Eigenschaften untersucht werden. In den einzelnen Kompartimenten des Probenträgers können gezielt chemische Synthesen durchgeführt werden, insbesondere Synthesen und/ oder Modifikationen organischer Moleküle, wie Synthese von Oligopeptiden oder Oligonukleotiden auf DNA- oder RNA-Basis, wobei die Verbindung

des Mikrodosiersystems mit mindestens 2 Dosierköpfen die gezielte kontaminationsfreie Zugabe von mindestens zwei unterschiedlichen Reagenzien in die Kompartimente erlaubt. Insbesondere lassen sich organische Moleküle, die biologisch aktive chemische Leitstrukturen aufweisen, positionsspezifisch in den Kompartimenten mit verschiedenen Substanzen und/oder Substanzgemischen zur Reaktion bringen und die dabei entstehenden unterschiedlichen Reaktionsprodukte auf bestimmte Eigenschaften analysieren.

Ferner betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Aufnahme einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Proben. Der hierzu vorgesehene Probenkörper weist eine Vielzahl von Kompartimenten (Reaktionskammern) zur Aufnahme der Proben auf. Ferner ist der Probenkörper mit mindestens einer Schicht aus einem ätzbaren Material versehen, in die mittels eines lithografischen Prozesses die Kompartimente oder Reaktionskammern bildende Hohlräume ausgebildet sind.

Der Abstand der Öffnungen benachbarter Kompartimente ist vorzugsweise kleiner als oder gleich 5 mm.

Die mindestens eine Schicht aus ätzbarem Material besteht vorzugsweise aus Silizium bzw. weist Silizium auf.

Alternativ können die Hohlräume in dem Probenkörper auch mit Hilfe der LIGA-Technik hergestellt werden; in diesem Fall besteht der Probenträger aus einem Kunststoffmaterial.

Eine weitere Variante des Probenträgers bezieht sich darauf, daß zur Aufnahme der Proben keine Vertiefungen o.dgl. in die Oberfläche des Probenträgers eingearbeitet sind, sondern daß der Probenträger hydrophobe Bereiche aufweist, auf die die Proben appliziert werden. Es ist

denkbar, daß der Probenträger in den Bereichen seiner hydrophoben Zonen Vertiefungen aufweist. Die hydrophoben Bereiche sind vorzugsweise an der Oberfläche des Probenträgers vorgesehen. Der Probenträger weist zweckmäßigerweise eine scheiben- oder plattenähnliche Struktur auf.

Gerade die Kombination von Mikropipette/Microdrop und lithografisch gefertigten Probenträgern erlaubt die Weiterentwicklung der Relaxationsmethoden. Das bedeutet das Vermessen kleinster Volumina bei hohen Feldstärken aber kleiner Spannung (z.B. mit der Beziehung für die Feldstärke $E = U/d$, einen Abstand von $d = 10 \mu\text{m}$ und einer Spannung von 10 V ergibt sich eine Feldstärke von 10 Kv/cm.

Folgende Methoden sind einsetzbar, um dielektrische Relaxation quantitativ vermessen zu können:

1. Kapazitätsänderung der Kammer
2. Optische detektierbare Veränderung (Fluoreszenz, Absorption)

In den klassischen Methoden (T-Sprung, Feldsprung, Drucksprung etc.) kommt ausschließlich der optische Nachweis zur Anwendung, weil die Kapazitätsänderung in den üblichen großen Volumina zu klein wäre, um detektierbar zu sein. Dies ist aber bei Miniaturisierung aufgrund kleiner Raummaße möglich, wie in PCT/EP94/00117 beschrieben (mit der Beziehung für einen einfachen Plattenkondensator $C = \epsilon_0 \epsilon_r A/d$ mit A als Fläche, d Abstand der Kondensatorflächen, ϵ_0 Dielektrizitätskonstante im Vakuum, ϵ_r relative Dielektrizitätskonstante (stoffabhängig, dimensionslos) ergibt sich ein Unterschied um den Faktor 1000 in der Kapazität bei einem Volumen von 1 ml (1 cm^3) im Vergleich zu einem 1 pl ($10 \mu\text{m}^3$).

Die erfindungsgemäße Vorrichtung läßt sich insbesondere zur Durchführung chemischer Relaxationsmethoden, insbesondere Drucksprung, Feldsprung und Temperatursprung verwenden.

Der erfindungsgemäße Probeneträger macht es möglich, parallel eine Vielzahl von chemischen und biologischen Reaktionen ablaufen zu lassen. Durch die Verfügbarkeit miniaturisierter Analyseverfahren, durch die sich die sogenannte "Fitness" eines Syntheseproduktes bezogen auf eine erwünschte Funktion bzw. Zielkategorie feststellen und quantitativ messen läßt, ist bereits die Synthese in Miniaturmaßstab möglich. Der erfindungsgemäße Probeneträger läßt sich gerade für derartige Syntheseverfahren einsetzen. Die Struktur einer solchen Fitnesslandschaft einer (un-)bekannten biologischen oder biochemischen oder chemischen Substanz, deren genaue Funktion unbekannt, aber deren gewünschte Zielkategorie (z.B. besser an eine andere Substanz zu binden) definiert ist, ist ebenfalls nicht bekannt oder verfügbar. Das nachfolgend vorgestellte Optimierungsverfahren kann genau diese Aufgabe erfüllen; es kann nämlich Strategien für Optimierung auf unbekannten Fitnesslandschaften vorschlagen und damit den Mitteleinsatz zusätzlich zur Miniaturisierung erhöhen. Dieses Optimierungsverfahren wird weiter unten am Beispiel einer Standardsynthese noch näher beschrieben.

Der erfindungsgemäße Probeneträger kann aber auch bei Verfahren zur Fitnessoptimierung beliebiger Bakterienpopulationen benutzt werden. Es lassen sich Sequenzabschnitte randomisieren, wobei über den Essay gelernt wird und stets dasselbe wiederholt wird. Dabei wird die MEM eingesetzt. Die hierzu notwendigen Oligosynthesen werden in deterministischer Weise allerdings in erheblich höherer Zahl hergestellt und in die entsprechenden Bakterien hineinkloniert.

Nachfolgend werden anhand der Figuren Ausführungsbeispiele der Erfindung näher erläutert. Im einzelnen zeigen:

- Fig. 1 schematisch den Probenträger und eine faser-optische Platte mit mit dieser gekoppelter CCD-Einrichtung,
- Fig. 2 ebenfalls schematisch die Aufbringung der Proben mit einem Mikrodosiersystem (Microdrop),
- Fig. 3 die Anordnung eines Zweifach-Mikrodosiersystems zur getrennten Abgabe zweier unterschiedlicher Proben, Reagenzien oder sonstiger Substanzen,
- Fig. 4 schematisch den Probenträger mit optischer Anregung der von diesem aufgenommenen Proben, wobei die Beobachtung der Proben über Lichtleiter und einen Detektor erfolgt,
- Fig. 5 ein Beispiel für einen Probenträger (ausschnittsweise Darstellung),
- Fig. 6 stark schematisiert mehrere übereinander angeordnete Probenträger, ebenfalls ausschnittsweise dargestellt,
- Fig. 7 eine schematische Darstellung einer Chromatographie mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Fig. 8 eine Draufsicht auf eine Vorrichtung, in der der Probenträger eingesetzt werden kann,
- Fig. 9 eine schematische Darstellung eines Systems, in dem der Probenträger einsetzbar ist,

- Fig. 10 ein Mikrodispensersystem, mit dem sich Proben auf den Probenträger applizieren lassen,
- Fig. 11 einen Ausschnitt des Probenträgers zur Darstellung einer Kammer, eines Kompartiments bzw. einer Ausnehmung des Probenträgers, wobei Fig. 11a eine schematische Darstellung, Fig. 11b eine mikroskopische Aufnahme einzelner Kammern und Fig. 11c ein Probenkammer-Array zeigt,
- Fig. 12a ein schematisches Beispiel einer Ausnehmung im Probenträger mit Siebboden,
- Fig. 12b eine mikroskopische Aufnahme einer Ausnehmung mit Siebboden eines Silizium-Wafers,
- Fig. 12c wie Fig. 12b, jedoch unter einem Winkel von ca. 15° zur Normalen,
- Fig. 13 prinzipiell die Verschiebbarkeit der Mikrodosiervorrichtung relativ zum den Probenträger haltenden Probenträgerhalter,
- Fig. 14 bis 31
Ausführungsbeispiele für die Ausbildung der Ausnehmungen und Böden eines Probenträgers, jeweils anhand einer schematischen Darstellung eines Kompartiments bzw. einer Ausnehmung, wobei die Fig. 29 bis 31 genauere Darstellungen des in Fig. 28 eingekreisten Bereiches A der Abdeckung des Probenträgers sind,
- Fig. 32 bis 38
Ausführungsbeispiele für die zur Lichteinkopplung und/oder Lichtauskopplung vorgesehenen Linsenarrays und

Fig. 39 ein Flußdiagramm einer automatisierten Peptid-Synthese.

Fig. 1 zeigt schematisch einen Probenträger und eine faseroptische Platte, die mit einer CCD-Einrichtung gekoppelt ist.

Die Fig. 2 zeigt schematisch, wie mit dem Mikrodosiersystem (Microdrop) die Proben direkt auf die Glasschicht einer CCD-Anordnung aufgetragen werden, wodurch geringer Intensitätsverlust bewirkt wird. Die Oberfläche der CCD ist aus Gründen der Inertheit noch mit einer dünnen Glasschicht versehen. Integriert werden können ferner Temperier- und Isolierschichten.

Fig. 3 zeigt schematisch die Anordnung des Mikrodosiersystems, und zwar ein Beispiel für die Anordnung von zwei Mikrodosiersystemen unter einem Winkel untereinander, d.h. unter einem spitzen Winkel zur Senkrechten zum Probenträger. Folgende Fälle können unterschieden werden:

- a) $\theta_1 = \theta_2, h_1 = h_2$
- b) $\theta_1 \neq \theta_2, h_1 = h_2$
- c) $\theta_1 \neq \theta_2, h_1 \neq h_2$

Mehrere Mikrodosiersysteme können hilfreich sein zur schnellen Beschickung, oder um empfindliche Reaktionen erst durch Aufbringen der Reaktanten am Reaktionsort zu starten. Auch lassen sich so Konkurrenzreaktionen mit der umgebenden Atmosphäre vermeiden.

Die beiden Mikrodosiersysteme (Microdrop) können auch senkrecht zum Probenträger in verschiedenen Höhen ($h_1 \neq h_2$) oder in gleichen Höhen ($h_1 = h_2$) angeordnet sein.

Fig. 4 zeigt schematisch, wie die Detektion auch über integrierte Lichtleiter im Probenträger möglich ist.

Fig. 5 zeigt schematisch eine bevorzugte Ausführungsform des Probenträgers. In einer Siebplatte werden kugelförmige oder faserartige Supports mit aktivierter Oberfläche analog zur Standardsynthese am Synthesizer in die einzelnen Reaktionskammern aufgebracht:

Die Synthese wird durch das Pipettieren verschiedener Lösungen mit Hilfe des Dosierkopfkarussells dem Protokoll entsprechend gestartet (siehe auch Fig. 10). Die einzelnen Positionen werden durch den (x,y)-Tisch angefahren.

Fig. 6 zeigt schematisch, wie zur Fraktionierung die zwei oder noch mehr Siebplatten übereinander angeordnet werden können, wobei benachbarte Siebbodenplatten mittels Wafer-Wafer-Bondens verbunden werden.

Die Produkte können über integrierte Sensoren z.B. Lichtleiter oder direkt mit einer CCD beobachtet werden. Zusätzlich ist das Beobachten der obersten Siebplatten mit einer CCD und einem Mikroskop möglich.

Fig. 7 beschreibt die Möglichkeit der Chromatographie mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung in schematischer Form.

Die Kapillarplatte (Probenträger) oder Chip wird mit verschiedenem Säulenmaterial beladen. Diese Platte wird nun mit einem Protein beladen, wobei getestet wird, in welchem Kanal das Protein zurückgehalten wird, also bindet.

Weitere Einsatzmöglichkeiten sind wie folgt:

Mehrere Chips obiger Konfiguration können mit Protein unterschiedlicher Salzkonzentration beladen werden. Da-

durch wird getestet, bei welchem Material und welcher Salzkonzentration das Protein eluiert oder gebunden bleibt.

Es werden auf einem Chip 'Felder' definiert, d.h. mehrere Reaktionskompartimente werden mit gleicher Füllung beschickt, das Protein wird dann in verschiedenen Salzkonzentrationen auf verschiedene Kompartimente geladen.

Affinitätstest:

Ebenso können beliebige Substanzen X'' in Kapillarplatten immobilisiert werden. Im Fluß werden die, diese substanzenbindende Substanzen y , bis y'' beladen. Die erfolgte Bindung wird durch das Messen des durchkommenden Anteils der y , bis y'' Substanzen gemessen.

Fig. 8 zeigt einen bevorzugten Aufbau des Systems aus Beobachtungseinheit CCD-Kamera Dosiersystem, (x,y)Tisch mit Probenträgerhalter, Entnahmeposition (Impfnadel) mit Dekontaminationsofen und einem Mikroskop zur Kontrolle.

Fig. 9 zeigt ein Schema der Komponenten einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung und ihrer Steuerung.

Fig. 10 zeigt den Aufbau des Dosierkopfkarussells (Mikrodispensiersystem) mit (x,y)-Tisch:

Die Dosierkopfhalterungen werden in die entsprechenden Passungen im Kopfkarsell eingesetzt. Dabei kann die elektrische Verbindung gleich mit hergestellt werden. Durch Verdrehen des Karussells werden die Dosierköpfe nacheinander an die Dosierposition gebracht.

Fig. 11 zeigt Beispiele der Probenkammern in Siliziumtechnik:

- a) Schema
- b) Mikroskopische Aufnahme einzelner Kammern mit Sichtfenster
- c) Probenkammerarray

Fig. 12a zeigt ein schematisches Beispiel eines Kompartiments (Siebkammer), in einem Siliziumträger.

Fig. 12b ist eine mikroskopische Aufnahme einzelner Siebkammern unter 0° (linker Teil) und unter 15° Sichtwinkel (rechter Teil).

Fig. 13 zeigt nochmals prinzipiell die Verschiebbarkeit der Mikrodosiervorrichtung relativ zum ebenfalls verschiebbaren Probenträgerhalter, vorzugsweise jeweils in x/y-Koordinaten. Mit dieser Vorrichtungsanordnung lassen sich in die in Zeilen und Spalten angeordneten Kompartimente des Probenträgers berührungslos Mikro-Proben einbringen.

Anstelle einer x/y-Steuerung von Mikrodosiervorrichtung und/oder Probenträgerhalter ist es auch möglich, beide Einheiten nach Art eines Plattenspielers relativ zueinander bewegt zu steuern. Die Kompartimente, die bei einer x/y-Steuerung vorzugsweise in Spalten und Zeilen angeordnet sind, sind beim "Plattenspieleraufbau" in konzentrischen Kreisen oder längs einer Spirale in dem Probenträger angeordnet. Die Mikrodosiervorrichtung wird bei rotierendem Probenträger vorzugsweise radial zu diesem bewegt. Die Bewegung der Mikrodosiervorrichtung und die Abgabe der Mikro-Proben erfolgt synchron zur Rotationsbewegung des Probenträgers bzw. -halters.

Die vorliegende Erfindung betrifft unter anderem eine Kombination aus einem Probenträger gekoppelt mit einem äußerst effizienten Mikrodosierungssystem (Pipettiersystem). Zum Zweck der Analyse kann ein Auswertesystem angeköpelt werden, vorzugsweise in Kombination mit einer CCD-Kamera. Es handelt sich um ein neuartiges System für Probenträger zur Aufnahme flüssiger Reaktionskompartimente, wobei die einzelnen Probenvolumina $\leq 10 \mu\text{l}$, vorzugsweise $1 \mu\text{l}$, betragen. Erfindungsgemäß ist die Probenträgertechnik mit einem System der Einzelprobenbeschickung kombiniert, das auf einem piezogesteuerten Dispenserprinzip beruht, wobei die Flächenpositionierung (x/y-Positionierung) mit einer Genauigkeit in einer Größenordnung von mindestens $10 \mu\text{m}$ mechanisch erfolgt. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kombiniert somit neuartige Probenträger mit einer Vielzahl mechanisch gegeneinander abgegrenzter Kompartimente, deren relative zweidimensionale Anordnung nach einem festgelegten Muster erfolgt, wobei die Kompartimente bevorzugt nach einem lithographischen Verfahren in einem Basisträger generiert werden. Ein piezo-gesteuertes Mikrodosiersystem als "Pipettiersystem" für Probenvolumina $\geq 5 \text{ pl}$ mit einer Dosierungsgenauigkeit $\leq 5 \%$ bei einer minimalen Tropfengröße von 5 pl und ein mechanisches Positioniersystem, das die gepulst verschossenen Mikrotröpfchen auf ein dafür vorgesehenes Reaktionsfeld computergesteuert positioniert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine Detektions- und Auswerteeinheit unmittelbar mit dem erfindungsgemäßen System verkoppelt, vorzugsweise über eine CCD-Kamera. Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt die parallele Analyse insbesondere unterschiedlicher Mutanten, wie sie bei Arbeiten zur evolutiven Optimierung von Biopolymeren entstehen.

Die Vorrichtung erlaubt die Durchführung eines Verfahrens zur Durchmusterung großer Populationen von vereinzelter Bakterien mit den vorher beschriebenen Eigenschaften. Zum Optimieren einer Eigenschaft, die beispielsweise durch ein 'Gen, der Länge 10 kodiert wird, ergibt dies durch Permutation 4^{10} ca. 1.000.000 Möglichkeiten, die zu analysieren sind. Andererseits ermöglicht die Vorrichtung die Synthese einer Vielzahl unterschiedlicher Oligomere im Bereich der Nukleotidsynthese oder der Peptidsynthese an festen Trägern oder in homogener Phase.

Bei Verwendung eines Mehrkanalpipettierkopfes lassen sich positionsspezifisch unterschiedliche Syntheseblöcke wie die vier aktivierten Nukleotidbausteine G,A,C,T oder G,A,C,U oder Synthone verschiedener Aminosäuren in zuvor am Rechner festgelegter Weise auf die jeweils gewählten Positionen des Probensträgers aufbringen, um positionsspezifisch definierte Oligomere zu synthetisieren und nachfolgend zu testen bzw. präparativ darzustellen.

Außer oligomeren Strukturen lassen sich auch organische Moleküle synthetisieren, bei denen es auf eine Herstellung geringer Mengen umfangreicher Kollektive von Strukturalternativen ankommt. Dies ist beispielsweise bei der Analyse von Derivaten der Fall, die in Form modifizierter Leitstrukturen generiert werden, wenn z.B. biologisch aktive Verbindungen optimiert werden sollen. Im Bereich der pharmazeutischen Chemie müssen Leitstrukturen oftmals hinsichtlich einer größeren Anzahl von Parametern optimiert werden neben einer reinen pharmakologischen Aktivität. Dies betrifft z.B. die Aufnahmezeit, die biologische Halbwertszeit, Toxizität der Abbauprodukte, Membrandiffusionseigenschaften etc. Anstelle gezielter Synthesen werden in der Zukunft vermehrt komplexe Gemische synthetisiert werden, sofern entsprechende Assays für die Detektion der gewünschten Eigenschaften bereitstehen und sofern

die molekularen Strukturen mit verbesserten Eigenschaften in einfacher Weise ermittelt werden können.

Bei der sogenannten AFFYMAX-Technik mit positionsspezifischen Licht-induzierten Kopplungsreaktionen (S.P.A. Fodor et al. (1991) Science 767 - 773) läßt sich eine spezifische Verbindung eindeutig aus ihrer jeweiligen x/y-Position bestimmen. Die Methode ist jedoch aus verschiedenen Gründen in ihrer Anwendungsbreite limitiert. Sie ist z. B. auf photoaktivierbare Kopplungsreaktionen beschränkt und erfordert umfangreiche Zwischen- und Waschschriffe bei jeder Reaktion, da alle Reaktionspositionen jeweils mit allen Reagentien in Kontakt kommen. Darüberhinaus muß die sequentielle Durchführung der Reaktionen bei Verwendung unterschiedlicher Reagentien pro Reaktionsschritt als Nachteil angesehen werden.

Bei dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren kommen jeweils nur die vorgesehenen Positionen mit den jeweiligen Reagentien in Kontakt. Deshalb lassen sich die Reaktionen parallel durchführen. Pro Position können ein Reagens oder auch ein Reagensgemisch zugesetzt werden. Das Gemisch kann dabei bereits im aufgetragenen Tropfen (Mikrodrop) vorliegen oder es kann hergestellt werden, indem aus verschiedenen Vorlagen unterschiedliche Reagentien oder Reagentien-gemische auf eine Position aufgetragen und dabei gemischt werden. Chemische Ausgangsprodukte lassen sich in aufeinander folgenden Schritten in den erfindungsgemäßen Probenkammern verbringen oder auf ebenen Flächen mit Hilfe der Dünnschichttechnik auftragen. So ist es möglich, vielfältige Synthesen vorzubereiten und zu einem beliebigen, späteren Zeitpunkt durch Aufbringen von geeigneten Lösungsmitteln für die vorgelegten, eventuell lyophilisierten Reaktanden oder Reaktionslösungen bzw. die Reaktion thermisch oder photochemisch zu starten.

Es ist möglich, durch Grenzflächenreaktionen durch Spin-off-Technik auf die Mikroreaktor-Arrays Ausgangssubstanzen aufzubringen. Umständliche präparative Schritte können so bei Verwendung der Proben-träger durch vorheriges Aufbringen der Ausgangssubstanzen erspart werden. Auch Biopolymere lassen sich unter Zusatz von Stabilisatoren wie bestimmten Zuckerverbindungen selbst in lyophilisierter Form stabilisieren.

Dies führt zur Zeit- und Arbeitersparnis beim Anwender. Darüberhinaus erlaubt diese Technik auch weniger gut ausgestatteten Laboratorien, aufwendige Synthesen durchzuführen. Lediglich ein Dispenser-System, mit dem Mikromengen an Lösungsmittel auf die (x,y)-Anordnung der Wafer verteilt werden kann, und eine entsprechende (x,y)-Verschiebeeinheit muß vorhanden sein, um bestimmte Reaktionen zu starten.

Durch den Einsatz der Planartechnik (z.B. Si-Technik, DS-Technik) bei der Herstellung der Mikrostruktur-Arrays wird das Design solcher Arrays gut kompatibel zu den bekannten Verfahren der Mikrosensorik, Mikroaktork.

Die Einführung der Sensoren in jedem einzelnen Kompartiment ist prinzipiell möglich (siehe Lichtleiter in Silizium: J. Müller Integrierte Optik auf Silizium im Abschlußbericht des VDI/VDE Verbundprojekts Entwicklung eines CMOS - kompatiblen Gesamtprozesses zur Herstellung integriert optoelektronischer Schaltungen auf Silizium (1989); Biosensoren: Scheller, Frieder, Schubert Florian Biosensoren Akademie - Verlag Berlin 89, BioTec (Informationstransfer der BioTec) Biosensoren, Literaturdokumentation von Kathrin Stein u. Klaus-Dietrich Neumann, Vogel Verlag, 91 Würzburg).

Einsatz als Mikro-Bioreaktor System

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt die Fraktionierung und Analyse von eukaryotischen Zellen bzw. deren Produkte nach Größe und Affinität. Es ist ferner möglich, Infektionen der eukaryotischen Zellen in geeigneter Weise zu verfolgen, Viruspartikeln oder Proteine oder andere Biomoleküle bestimmter Anzahl zu fraktionieren und ortsspezifisch zu applizieren.

Dies wird durch die erfindungsgemäße Vorrichtung in ihrer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht: Probenkammern mit integrierter Membran bzw. Siebstruktur, die sich z.B. lithographisch herstellen läßt, ermöglichen den Aufbau von übereinander gestaffelt angeordneten Probenkammern vorzugsweise unterschiedlicher Siebstruktur und Porengröße (siehe Fig. 6, 12a-c). Pro Kammer der obersten Anordnung lassen sich eukaryotische Zellen vereinzeln, welche direkt oder nach einer Zuchtungsphase in Kontakt mit Medium von oben mikroskopisch oder fluorimetrisch vermessen werden können. Werden die Zellen z.B. mit einem Virus infiziert, können spezifische Veränderungen verfolgt werden, z.B. eine Lyse. Bestimmte Stoffwechselprodukte lassen sich z.B. durch nachfolgendes Absaugen mittels der Siebe auftrennen und detektieren. Die einzelnen Siebe können dabei auch chromatographische Trennphasen darstellen.

Bakterien, Lumineszenz - Detektion:

In ein Reportergen (z.B. Luciferase) wurde ein Gruppe 1-Intron insertiert. Im Bakterium (E. Coli) wird nach Splicen durch die entsprechende Ribozymaktivität eine funktionstüchtige mRNA erzeugt, das für die Luciferase kodiert. Die Effizienz des Prozesses wird an der Intensität der durch die Luciferase vermittelten Biolumineszenz gemessen.

Ein Reportergen wird zusammen mit einem Plasmid, das ein Ribozym kodiert, das spezifisch mRNA eines Reportergen erkennt und schneidet, in ein Bakterium kloniert. Schneidet das Ribozym korrekt, entsteht ein inaktives Reportergen; schneidet es dagegen nicht, ist das Reportergen aktiv und kann über das entstehende Lumineszenz Signal z.B. von einer CCD-Kamera erfaßt werden.

Temperaturresistente RNA-Polymerase (in vitro) Q β -RNA-Sequenzen, die alle für die Replikation wichtigen Strukturen und das aktive Cistron für die Q β -Replikase enthalten, sollten in ihrer Temperaturstabilität erhöht werden. Zusammen mit einem in vitro Translationssystem und einer anfangs zugegebenen Replikase werden durch sogenannte Serial-Transfer-Experimente temperaturstabile Replikasen gezüchtet. Serial-Transfer-Experimente bedeuten ein konzentrationsabhängiges Überimpfen selektierter Proben und Verdünnen auf neue erfindungsgemäße Probenträger die in diesem Fall mit einer Temperiertvorrichtung ausgestattet sind. Durch Anlegen eines Temperaturgradienten von Platte zu Platte oder innerhalb einer Platte lassen sich die Temperaturbedingungen gezielt festlegen.

Mit Dünnschicht- bzw. klassischer Chiptechnologie lassen sich Probenträger mit integrierten Temperatursensoren, Heizvorrichtungen bis zu Lichtleitern oder photoempfindlichen Strukturen herstellen (siehe S. Büttgenbach, Mikro-mechanik, Teubner 91; W.M. Moreau, Semiconductor Lithography, Plenum Press 88; Micro Systems Proceedings, Bände 90/91/92, Herbert Reichl Editor; Köhler, M.: Bridges of Metallic and Dielectric Films in the Micron and Submikron Range). Damit ist es möglich, in sehr kleinen Dimensionen (gl - pl - Bereich) Experimente durchzuführen, die das Durchmustern großer Probenzahlen erlaubt. Dies ermöglicht auch die Durchführung temperaturgesteuerter Experimente. Eingebaute Sensoren erlauben darüberhinaus die chemische

Analyse der Produkte (Physikalische Sensoren: Temperatur, Licht (online); chemische Sensoren: Schichten mit Nachweisreagentien).

Nachfolgend soll anhand der Fign. 14 bis 31 auf einzelne Ausführungsbeispiele des Probenträgers eingegangen werden. In diesen Figuren ist die Ausbildung des Probenträgers anhand einer Ausnehmung desselben dargestellt. Für die Fign. 14 bis 31 gilt, daß der Probenträger (Silizium-Wafer) mit dem Bezugszeichen 50 bezeichnet ist, eine in diesem Probenträger 50 ausgebildete Ausnehmung mit 52 bezeichnet ist und der Siebboden der Ausnehmung 52 mit 54 gekennzeichnet ist. Teilweise ist in den Figuren bei 56 eine von der Ausnehmung 52 aufgenommene Flüssigkeitsmenge dargestellt.

Anhand von Fig. 14 soll kurz auf die Dimensionierung eines hier beispielhaft gezeigten Probenträgers 50 eingegangen werden. Der Probenträger 50 ist scheibenförmig ausgebildet und kann eine Gesamthöhe (Erstreckung zwischen Oberseite 58 und Unterseite 60) zwischen etwa 30,3 bis 3300 μm aufweisen. Die Höhe einer Ausnehmung 52, d.h. der Abstand zwischen der Oberseite 58 und dem Siebboden 54 kann zwischen etwa 30 und 3000 μm betragen. Die Dicke des Siebbodens 54 kann damit zwischen etwa 0,3 bis 300 μm liegen. Die Porenweite im Siebboden 54 kann ca. 0,2 bis 200 μm betragen, während der Boden zwischen 1 bis 2000 μm breit sein kann. Die gesamte Ausdehnung der Ausnehmung 52 (Kammerweite) kann zwischen 20 bis 5000 μm betragen.

Fig. 15 zeigt einen Probenträger 50 mit einem halbseitig perforierten Boden 54, der in seinem nicht perforierten Abschnitt 62 zur Lichteinkopplung (bei 63 angedeutet) transparent ist.

Fig. 16 zeigt eine Variante eines Probenträgers mit einem halbseitig semitransparenten Siebboden 54, der über eine Hälfte seiner Fläche mit einer aufgesputterten Filterschicht 64 für eine teilreflektierende Lichteinkopplung (bei 66 angedeutet) über den Boden ausgestattet ist. Die Filterschicht 64 weist vorzugsweise eine Dicke zwischen 20 bis 500 nm auf.

Fig. 17 zeigt einen Probenträger 50 mit geteilter transparenter Bodenhälfte für ungedämpfte und abgeschwächte bzw. teilreflektierte Lichteinkopplung und gleichzeitige volle Lichteinkopplung über zwei Teilstrahlen (Breite ca. 2 bis 2000 μm). Die geschlossene Bodenhälfte ist bei 68 dargestellt und weist einen bei 70 angedeuteten transparenten Teil und einen bei 72 angedeuteten semitransparenten teilreflektierenden Teil auf. Die Lichtstrahlen des Einkopplungslichtes sind bei 74, 76 angedeutet.

In Fig. 18 ist ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Probenträgers 50 dargestellt. Dieser Probenträger 50 ist auf seiner Oberseite mit einer Abdeckung 78 versehen, die eine mit der Ausnehmung 52 fluchtende Durchlaßöffnung 80 aufweist, über die eine Probe in die Ausnehmung 52 appliziert wird. Die Abdeckung besteht beispielsweise aus Silizium, Quarz, Polymer wie beispielsweise PMMA oder Glas und kann eine Dicke im Bereich zwischen 50 bis 5000 μm aufweisen. Die Weite der Durchlaßöffnung 80 kann zwischen 20 bis 2000 μm liegen. Die Halterung der Abdeckung 78 an dem Probenträger 50 erfolgt beispielsweise durch mechanische Klemmung, die wieder lösbar ist, oder durch Kleben (Klebspalt) oder durch anodisches Bonden oder Wafer-Wafer-Bonden.

Fig. 19 zeigt den Fall eines Probenträgers 50 mit Abdeckung 78 und halbseitig perforiertem Siebboden, der halbseitig transparent für die Lichteinkopplung ist. Der

geschlossene und für die Lichteinkopplung transparente Teil des Bodens ist bei 62 dargestellt.

Eine Variante zur Ausführungsform gemäß Fig. 18 ist in Fig. 20 dargestellt. Dort ist der Boden einer Ausnehmung 52 des Probenträgers 50 halbseitig semitransparent für eine teilreflektierende Lichteinkopplung (bei 66 angedeutet) ausgebildet. Der halbseitige semitransparente Teil des Siebbodens ist bei 64 zu erkennen.

Fig. 21 schließlich zeigt die Kombination der Ausführungsform gemäß Fign. 17 und 18.

Fig. 22 zeigt einen Probenträger 50 mit halbseitig geschlossenem Siebboden (geschlossener Teil bei 62 dargestellt), der der Aufnahme von integrierten Mikrosensoren oder Mikroaktoren dient. Diese Mikrosensoren sind zweckmäßigerweise im geschlossenen Teil 62 des Bodens integriert.

Ein Beispiel für einen Probenträger 50 mit halbseitig geschlossenem Siebboden 54 (geschlossener Teil ist bei 62 angedeutet) und in diesem bzw. an diesem angeordneten integrierten Dünnschichtheizer 82 ist in Fig. 23 dargestellt. Der Dünnschichtheizer 82 besteht aus Metall, einer Metallegierung oder einem Metalloxid und kann Schichtdicken zwischen 40 nm bis 4 μ m aufweisen. Er kann in Form eines Streifenelementes oder mäanderförmig mit Leiterbahnbreiten von ca. 1 bis 2000 μ m ausgebildet sein. Der integrierte Dünnschichtheizer 82 kann funktionsmäßig kombiniert sein mit der halbdurchlässigen Reflektionsschicht (s. Filterschicht 64 in Fig. 16) und kann gleichzeitig als Meß- oder als Heizelement in einer Dicke zwischen 30 bis 300 μ m ausgeführt sein.

In Fig. 24 ist ein Probenträger 50 dargestellt, dessen geschlossener Teil 62 seines Siebbodens 54 mit einem integrierten Dünnschichtheizer 82 als Heizelement und einem integrierten Dünnschicht-Meßwiderstand 84 (Thermistor) für die simultane Temperatursteuerung und Kontrolle, gegebenenfalls als Regelkreis ausgelegt, versehen ist.

Gemäß dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 25 wird das Meßelement als Mikro-Thermopile 86 zur genauen Messung lokaler Temperaturgradienten ausgeführt. Derartige Meßelemente sind an sich bekannt.

Fig. 26 schließlich zeigt den Fall eines Probenträgers 50 mit einem an der Unterseite angeordneten Dünnschicht-Wellenleiter 88, der über ein Einkopplungsglied (optisches Element) 90 durch einen transparenten und ansonsten geschlossenen Bereich 92 des Siebbodens 54 Licht in die Ausnehmung 52 einkoppelt. Selbstverständlich kann die in Fig. 26 dargestellte Ausführungsform auch Licht aus der Ausnehmung 52 auskoppeln.

Schließlich ist in Fig. 27 eine Kombination der Ausführungsformen nach den Fign. 24 und 26 dargestellt. Der Probenträger 50 der Fig. 27 weist also einen Dünnschicht-Wellenleiter 88 zum Ein- und Auskoppeln von Licht in die Ausnehmung 52 hinein und aus der Ausnehmung 52 heraus auf. Zusätzlich ist im Bereich des transparenten geschlossenen Bodenbereichs 92 ein thermischer Sensor und Mikroheizer (bei 94 angedeutet) integriert.

Fig. 28 zeigt ein Ausführungsbeispiel eines Probenträgers 50 mit einer Abdeckung 78 (wie in Fig. 18), wobei unterhalb der Abdeckung 78 (im bei A angedeuteten Bereich) ein der betreffenden Ausnehmung 52 zugeordnetes Sensor- oder Aktuatorelement angeordnet ist. Dieses Sensor- und/oder Aktuatorelement kann gemäß Fig. 29 ein Dünnschichtwider-

stand 95 mit einer Schichtdicke von 40 bis 4000 μm als Mikroheizer oder Thermistor mit einer Breite von ca. 1 bis 2000 μm sein. Gemäß Fig. 30 kann es sich bei dem innen an der Abdeckung 78 befindlichen Element um Mikroelektroden 96, beispielsweise aus Pt, Pd, Au, Al, Cr oder Ti mit Breiten zwischen 0,3 und 2000 μm für lokale elektrochemische Umwandlung und/oder lokale Elektromigration, elektroforetische Trennung oder Molekülsorting handeln. Der Elektrodenabstand beträgt vorzugsweise 0,6 bis 2000 μm , während die Elektrodenstärke (Dicke) im Bereich zwischen 40 bis 4000 nm liegen kann. Bei dem unterhalb der Abdeckung 78 angeordneten Element kann es sich auch um freitragende Mikroelektroden 97 handeln (s. Fig. 31), die der mikrokapazitiven Messung und/oder einer moleküldynamischen Relaktationsmessung bei hohen lokalen Feldstärken dienen. Die Spannweite der Luftbrücke zwischen den Mikroelektroden 97 beträgt etwa 0,5 und kann bis 2000 μm betragen. Die Elektrodendicke liegt bei 40 nm bis 2000 μm , die Spannweite zwischen 0,1 und 200 μm , vorzugsweise zwischen 1 bis 4 μm .

In Fig. 32 ist in Explosionsdarstellung ein Probenenträger 100 mit diesem über einen Abstandsring 102 verbundenem Doppel-Linsenarray 104 dargestellt. Die Darstellung im zusammengebauten Zustand zeigt Fig. 33. Der Probenenträger 100 ist mit einer Vielzahl von Ausnehmungen 106 versehen, die geschlossene oder poröse Böden 108 aufweisen. Der Abstandsring bzw. Abstandskörper 102 ist an der Unterseite 110 des Probenenträgers 100 befestigt und hält das an ihm anliegende Doppel-Linsenarray 104 auf Abstand zu den Böden 108. Das Doppel-Linsenarray 104 besteht aus einer transparenten Platte 112, die an ihren großflächigen Seiten mit Linsen 114 (auf der Oberseite) und 116 (auf der Unterseite) versehen ist. Dabei fallen die optischen Achsen zweier einander gegenüberliegender Linsen 114, 116 zusammen, wobei diese optischen Achsen mit der Mittelachse

einer Ausnehmung 106 zusammenfallen. Jeder Ausnehmung 106 sind also zwei Linsen 114,116 zugeordnet. Mit dem Doppel-Linsenarray 104 ist es möglich, aus den Bodenbereichen 108 der Ausnehmungen 106 austretendes Licht auf einen Empfänger, beispielsweise eine CCD-Kamera zu projizieren. Proben-träger 100, Abstandshalter 102 und Doppel-Linsenarray 104 sind durch Kleben oder anodisches Bonden miteinander verbunden. Die Mikrolinsen 114,116 können je nach erforderlicher Brennweite und optischer Qualität als sphärische oder Fresnel-Linsen ausgeführt sein. Die Ausführungsform gemäß den Fign. 32 und 33 sowie die nachfolgend noch zu beschreibenden Ausführungsbeispiele gemäß den Fign. 34 bis 38 sind als faseroptische Platte bei den Ausführungsformen den Fign. 1 und 2 einsetzbar.

Eine andere Ausgestaltung einer Kombination von Mikrolinsen mit dem Proben-träger ist in Fig. 34 dargestellt. Dort befinden sich die Mikrolinsen 118 direkt an der Unterseite der Böden 108 des Proben-trägers 100.

Zur Projektion von nach oben aus den Ausnehmungen 106 austretendem Licht wird ein Aufbau wie in Fig. 35 gezeigt vorgeschlagen. Der Proben-träger 100 weist an seiner Oberseite eine transparente Platte 120 auf, auf deren dem Proben-träger 100 abgewandten Oberseite Mikrolinsen 122 angeordnet sind, wobei jede Mikrolinse 122 einer Ausnehmung 106, nämlich der unter ihr angeordneten, zugeordnet ist. Die planparallele Platte aus optisch transparentem Material besteht beispielsweise aus Glas oder Polymer und weist eine Dicke im Bereich zwischen 0,1 und 30 mm auf. Die Verbindung dieser Platte 120 mit dem Proben-träger 100 ist dergestalt, daß die optischen Achsen der Mikrolinsen 122 sich in den Mittelachsen der Ausnehmungen 106 fortsetzen.

Fig. 36 zeigt eine Alternative zu Fig. 35, wobei die Mikrolinsen 124 auf der dem Probenträger 100 zugewandten Unterseite der planparallelen Platte 120 aus optisch transparentem Material angeordnet sind. Auch für das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 36 gilt, daß die Mikrolinsen 124 achsenzentriert zu den Ausnehmungen 106 angeordnet sind. Die Mikrolinsen 124 weisen vorzugsweise Brennweiten von ca. 0,1 bis 5 mm auf.

Fig. 37 zeigt die Kombination aus den Fign. 35 und 36. Auf der Oberseite des Probenträgers 100 ist die planparallele Platte 120 aus optisch transparentem Material angebracht, die, einander gegenüberliegenden, auf ihrer Oberseite und ihrer Unterseite Mikrolinsen 122, 124 aufweist. Ein Paar von Mikrolinsen 122, 124 ist jeweils einander gegenüberliegend angeordnet, so daß die optischen Achsen beider Linsen zusammenfallen. Es handelt sich bei dem Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 37, wie bei demjenigen gemäß den Fign. 32 und 33, um die Kombination eines Probenträgers mit einem Doppel-Linsenarray. Das Doppel-Linsenarray gemäß Fig. 37 ist achsenzentriert zu den Ausnehmungen 106 angeordnet. Die Wahl der Plattendicke und Brennweiten der Linsen ist vorzugsweise dergestalt, daß in den Ausnehmungen 106 entstehendes Licht in parallele oder leicht konvergierende Strahlenbündel gebracht wird.

Fig. 38 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel einer Kombination aus Probenträger 100 und Linsenarray, wobei die planparallele Platte 120 dieses Linsenarrays direkt an der Unterseite des Probenträgers 100 anliegt. Achsenzentriert zu den Ausnehmungen 106 sind an der Unterseite der planparallelen Platte 120 die Mikrolinsen 126 angebracht. Über die Dicke der planparallelen Platte 120 kann der günstigste Abstand zwischen Linsenarray und Bodenbereich des Probenträgers 100 eingestellt werden. Der Dickenbereich der

Platte liegt vorzugsweise im Bereich zwischen 0,1 und 30 mm.

Für die in den Fign. 32 bis 38 beschriebenen Ausführungsformen gilt, daß die Bodenbereiche der Ausnehmungen geschlossen oder porös ausgebildet sein können. In beiden Fällen läßt sich ein Einfach- oder Doppel-Linsenarray zur Lichtein- und zur Lichtauskopplung am Probenträger anbringen.

Nachfolgend soll noch auf die Verwendung eines Probenträgers einer der vorstehend beschriebenen Arten zur Synthese eingegangen werden. In einer Standardsynthese wird zunächst der übliche Schritt des Bindens eines Nukleotids durchgeführt. Dabei werden folgende tabellarisch aufgeführten Schritte durch Anfahren der jeweiligen Pipettierposition (Dosierkopf mit entsprechender Lösung wird zur Applikation in eine gewünschte Ausnehmung des Probenträgers bewegt) vollzogen:

DNA-Synthese nach einem Standardprotokoll

1.	Waschen des Supports mit Dichlorethan	DCA	1.50 min	15 s
2.	Deprotection der 5'-OH-Gruppe der terminalen 2'-Deoxyribose, Entfernen der DMTr-Gruppe	Detrit.	3.00 min	30 s
3.	Entfernen der DMTr-Gruppe	DCA	2.00 min	20 s
4.	Waschen mit Acetonitril, um wasserfreie Bedingungen für Kupplung zu bekommen	Aceto.	1.00 min	10 s
5.	Aktivierung der Phosphoamidite mit Tetrazol und Kupplung	Aceto. : Tetra. 1 : 4	2.00 min	20 s
6.	Waschen	Aceto.	0.30 min	3 s
7.	Capping A	Cap. A	0.10 min	1 s
8.	Capping B	Cap. B	0.10 min	1 s
9.	Waschen	Aceto.	0.30 min	3 s
10.	Oxidation	Ox.	0.10 min	5 s
11.	Waschen	Aceto.	0.50 min	5 s
12.	Für weitere Zyklen: Wiederholung von 1. bis 11.			
13.	Nach letztem Zyklus: Wiederholung von 1. bis 4.			

Die Reaktionszeiten lassen sich bei Optimierung des Prozesses um einen Faktor 10 (letzte Spalte) reduzieren. Beim Waschen können und sollen große Mengen Material eingesetzt werden (relativ billig). Bei Schritt 5. dagegen muß mit möglichst geringen Mengen gearbeitet werden. Das Volumen pro Kammer beträgt 100 nl, das mit Support (z.B. Glasstaub, Harze) befüllt ist. Bei Schritt 5. muß für eine ausreichende Benetzung gesorgt werden.

Eine solche Standardoligo - oder (analog) Peptidsynthese wird für Sequenzen der Länge m n -mal wiederholt.

Bei Peptidsequenzen unbekannter Eigenschaft (und das wird meistens der Fall sein) wird mit einer Bindungsstudie z.B. Antigen etc. die Qualität des entstandenen Peptides getestet. Diese z.B. in Leuchtkraft gemessene Fitness mit der Sequenzzuordnung wird dem Rechner zur Feststellung der Fitnesslandschaft und anschließender Optimierung überlassen.

Ein solches Verfahren wird im folgenden beschrieben.

Man startet mit einer Zufallspopulation von Peptiden, die jedoch auch an einigen Regionen konstant sein dürfen (z.B. künstliche Immunglobuline). Diese werden synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht, d.h. jeder Sequenz wird ein Fitnesswert zugeordnet. Ein neuronales Netz (NN) wird nun trainiert, indem man die Abhängigkeit von Sequenz und Fitnesswerten lernen läßt. Das NN hat lediglich die Aufgabe, die Fitnessfunktion zu lernen, die man bei vielen Aufgaben nicht kennt. Parallel dazu läßt man Algorithmen evolvieren.

- Monomer [Position] = Monomer oder chemische Gruppe oder Zufallseinheit.
- Monomer [Position 1 - Position 2] = definierte Monomerfolge oder definierte chemische Gruppenfolge oder Zufallssequenz.
- if Monomer [Position] = Monomer oder chemische Gruppe then toto Zeilennummer.
- goto Zeilennummer.
- writeln (Monomer oder Monomer [Position]).
- Callproc_i (Monomer oder Monomerfolge).

Diese Programme sollen Peptide (oder andere Biopolymere oder für bestimmte innerhalb eines Bakteriums kodierende Gensequenzen) konstruieren. Diese Peptide (oder anderes biologisches Material) werden dem NN gegeben, welches dazugehörige Fitnesswerte abschätzt, die wiederum als Grundlage zur Algorithmusbewertung dienen. Hat man einen Algorithmus gewonnen, dessen Fitness einem Grenzkriterium genügt, werden entsprechend diesem Algorithmus Peptide synthetisiert und das gesamte Verfahren iteriert.

Eine graphische Darstellung einer automatisierten Peptidsynthese ist als Flußdiagramm in Fig. 39 gezeigt. Die Schritte 158 bis 162 lassen sich alternativ oder auch zusätzlich für die Sequenzen selbst durchführen. Bei Schritt 158 können also alternativ oder zusätzlich auch N Sequenzen über ein herkömmliches Optimierungsverfahren selbst gefunden werden. Entsprechend wird dann alternativ oder zusätzlich in Schritt 160 der Fitnesswert für jede der N Sequenzen mit Hilfe des trainierten NN ermittelt. Schließlich wird die Abfrage in Schritt 162 dahingehend geändert oder ergänzt, daß abgefragt wird, ob eine "gute" Sequenz ermittelt wurde.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wäre es möglich Peptide zu gewinnen, die HIV neutralisieren. Die synthetisierten Peptide müssen lediglich auf ihre Wirksamkeit bezüglich HIV untersucht werden. Das NN lernt dann, Sequenzen bezüglich ihrer Wirksamkeit gegenüber HIV zu kategorisieren. Die Vorteile eines solchen Vorgehens sind die Erlangung

- einer Konstruktion eines NN, welches gelernt hat, gewisse Bewertungskriterien bezüglich der gewünschten Eigenschaften zu verallgemeinern,
- eines Algorithmus, von dem man lernen kann, welche strukturellen Eigenschaften ein Biopolymer haben muß, um eine gewünschte funktionale Eigenschaft zu erzielen,

- des Peptids als Molekül selbst und
- neuer Einsichten über antivirale Strategien, Binde-domänen etc.

Mit Hilfe der hier beschriebenen Einrichtungen kann eine Evolutionsmaschine mit folgendem Charakteristika aufgebaut werden: Einzelreaktoren des Volumens 1 nl bis zu 100 nl bilden ein zweidimensionales Feld (Array) von Kammern. Jede einzelne Kammer ist durch ihre Position in x- und in y-Richtung exakt definiert. X-y-Tische mit den erforderlichen Positioniergenauigkeiten sind kommerziell verfügbar. Der als Kammerträger fungierende Wafer ist mit dem xy-Tisch starr verbunden. Über den PC-gesteuerten Tisch läßt sich jede gewünschte Kammer in jede gewünschte Position bringen. Damit kann jede Kammer in beliebiger zeitlicher Reihenfolge unter jeder der Entnahmepositionen (Nadel) und des Mikrodosiersystems bzw. unter jedem Sensor plaziert werden. Über ein Tischsteuerprogramm kann die systematische Abfrage der einzelnen Kammern oder von Stichproben erfolgen. Die Transferoperationen und die Ergebnisse von Meßvorgängen können mit den dazugehörigen Zeit- und Ortsangaben auf einem digitalen Datenspeicher (z.B. Festplatte) abgelegt werden.

Durch die Festlegung im Bus-Steuerprogramm kann die automatische Abarbeitung von Parallelversuchen mit Transferoperationen und Meßvorgängen sehr rationell organisiert werden. Die Auswertung über den Steuerrechner erleichtert entscheidend die Datenzuordnung und garantiert auch bei großer Kammerzahl und damit großer Anzahl von Einzeloperationen ein geringes Fehlerrisiko. Mit Hilfe der Speicherung der Daten von allen Einzeloperationen lassen sich Prozeßabläufe leicht rekonstruieren.

Durch die Rechnerkontrolle kann auch ein verzweigtes Arbeitsprogramm aufgebaut werden, bei dem die Abhängigkeit

von Meßergebnissen (z.B. als Maß für Stoffwechselaktivität oder Produktkonzentration) Entscheidungen über Transferoperationen vorgenommen werden. Die notwendigen Meßoperationen lassen sich ebenfalls nach dieser ergebnisorientierten Programmentscheidung automatisch festlegen. Damit wird ein selbstoptimierender Automat verwirklicht.

Durch die große Anzahl arbeitender Reaktionskammern kann einerseits die Wirkung vieler verschiedener Streßfaktoren auf ein Produkt in einem Durchlauf getestet werden. Andererseits können viele verschiedene Produkte unter Einwirkung eines Streßfaktors getestet werden. Sektorweise oder zeilenweise lassen sich Streßfaktoren paar- oder gruppenweise in feinen Konzentrationsabstufungen kombinieren. In Abhängigkeit vom Steuerprogramm können Wachstumsvorgänge auch in einer Sukzession des Einwirkens unterschiedlicher Streßkombinationen, d.h. Selektionsfaktoren ablaufen, wenn die entsprechenden Transferoperationen durchgeführt werden. Dadurch wird eine Wachstumslinie einer Abfolge unterschiedlicher Bewertungslandschaften unterworfen, wobei die Auswahlkriterien fest oder bedingt vorherbestimmt sein können. Auf diese Weise lassen sich in einer solchen Evolutionsmaschine geradezu komplexe Selektionspfade konstruieren oder untersuchen. Gegebenenfalls lassen sich auch Konkurrenzverhältnisse und Rekombinationsprozesse nach größeren evolutiven Schleifen experimentell erkunden.

Thermostatierung und Thermoisolation dienen dem Zweck, die gewünschten Wachstums- oder Reaktionstemperaturen einzustellen. Lokale Temperaturgradienten können über integrierte Mikroheizer eingestellt werden, die in Dünnschichttechnik auf dem Trägerwafer ausgeführt sind.

Während die Zuordnung des Mikrodosiersystems zu einer bestimmten Kammer über den xy-Tisch erfolgt, muß die Kapillarspitze bzw. die Impfnadel zum Zwecke der Proben-

entnahme oder Probenzuführung in eine Kammer in z-Richtung abgesenkt werden. Im abgesenkten Zustand ist kein xy-Transport möglich. Der Transport in z-Richtung muß über einen separaten Antrieb (Schrittmotor) erfolgen.

Als Sensoren zur Messung von Reaktionsverläufen bzw. mikrobiellem Wachstum bieten sich spektroskopische oder fluorimetrische Verfahren an, da bei diesen Verfahren kein direkter Kontakt zwischen Lösung und Sonde zu bestehen braucht. Über Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen läßt sich eine mittlere bis hohe Selektivität der Meßverfahren erreichen.

Um die Messung bei hoher Meßrate genau zu gestalten, d.h. hohe Integrationszeiten zu ermöglichen, ist der Einsatz einer CCD-Kamera anstelle von Einzelsonden sinnvoll.

ANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Aufnahme einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Proben, mit
 - mindestens einem mikromechanischen Probenträger mit einer Unterseite und einer dieser abgewandten Oberseite, in der eine Vielzahl von mit Böden versehenen Ausnehmungen auf nicht-spanende Weise, insbesondere durch Ätzen gebildet sind, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung von sich zwischen der Oberseite und der Unterseite des Probenträgers erstreckenden Durchlässen die Böden der Ausnehmungen zumindest teilweise porös sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Boden zumindest teilweise porös ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand benachbarter Ausnehmungen kleiner als oder gleich 5 mm ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenkörper aus einem Halbleiter-Material der Gruppe III bis VIII der Elemente des Periodensystems, insbesondere Silizium, besteht oder dieses Halbleiter-Material insbesondere Silizium aufweist und daß zur Herstellung der Ausnehmungen ein Lithographie-Prozeß verwendet wird.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenträger aus einem Kunststoffmaterial besteht oder dieses aufweist und daß die Ausnehmungen mittels LIGA-Technik hergestellt sind.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Probenträger scheiben- oder plattenförmig, insbesondere nach Art eines Wafer, ausgebildet ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Probenträger übereinander angeordnet sind, wobei die porösen Böden der Ausnehmungen eines Probenträgers mit den Ausnehmungen und Böden eines benachbarten Probenträgers fluchtend ausgerichtet sind.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausnehmungen diese begrenzende Flächen aufweisen, die mit für die jeweilige chemische und/oder biologische Reaktion inertem Material versehen sind.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausnehmungen mindestens ein chromatographisches Trennmaterial beinhalten.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Böden jeweils teilweise mit einer Filterschicht aus einem semitransparenten Material zur teilreflektierenden Einkopplung elektromagnetischer Strahlung, insbesondere Licht, versehen sind.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Filterschicht gesputtert ist.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Böden jeweils mit einer Filterschicht aus einem für elektromagnetische Wel-

len, insbesondere Licht, transparenten Material versehen ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Böden jeweils mit Schichten zur ungedämpften und abgeschwächten bzw. teilreflektierten Einkopplung und gleichzeitig vollen Einkopplung von elektromagnetischer Strahlung, insbesondere Licht, durch getrennte Teilstrahlen versehen sind.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Oberseite des Probenträgers oder, im Falle mehrerer übereinander angeordneter Probenträger, auf der Oberseite des obersten Probenträgers eine Abdeckung mit einzelnen mit den Ausnehmungen fluchtenden Durchlaßöffnungen angeordnet ist, die jeweils kleiner als der Öffnungsquerschnitt der Ausnehmungen in der Oberseite des Probenträgers sind.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Abdeckung mit dem Probenträger durch insbesondere lösbare mechanische Klemmung, durch Kleben, durch anodisches Bonden oder durch Wafer-Wafer-Bonden verbunden ist.
16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Abdeckung aus einem ätzbaren Material besteht und die Durchlaßöffnungen durch Ätzen litographisch hergestellt sind.
17. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Abdeckung aus einem Kunststoffmaterial besteht oder dies aufweist und daß die Durchlaßöffnungen mittels LIGA-Technik hergestellt sind.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausnehmungen oder die den Ausnehmungen des Probenträgers zugewandte Unterseite der Abdeckung für insbesondere jede Ausnehmung mit einem Widerstandselement, insbesondere einem Dünnschichtwiderstand, als Mikroheizer oder Thermistor versehen ist.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausnehmungen oder die den Ausnehmungen des Probenträgers zugewandte Unterseite der Abdeckung für insbesondere jede Ausnehmung mit Elektroden für lokale elektrochemische Umwandlung und/oder Molekülsortierung versehen ist.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausnehmungen oder die den Ausnehmungen des Probenträgers zugewandte Unterseite der Abdeckung für insbesondere jede Ausnehmung mit Elektroden für mikrokapazitive Messungen und/oder die Applikation moleküldynamischer Feldstärken versehen ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Boden einen geschlossenen und einen porösen Bodenbereich aufweist, die nebeneinander angeordnet sind.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß jede Ausnehmung und insbesondere jeder Boden mit einem elektrischen Widerstandselement, insbesondere Dünnschichtwiderstand als Heizelement versehen ist, das bzw. der in den Boden integriert ist.

23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Material des Widerstandselements eine halbdurchlässige Reflexionsschicht bildet.
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß jede Ausnehmung und insbesondere jeder Boden mit einem insbesondere integrierten elektrischen Widerstandselement, insbesondere Dünnschichtwiderstand als Heizelement und mit einem weiteren insbesondere integrierten elektrischen Widerstandselement, insbesondere Meßwiderstand versehen ist.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß jede Ausnehmung und insbesondere jeder Boden mit einem optischen Lichtwellenleiter gekoppelt, insbesondere verbunden ist, dessen eines Ende über ein Koppelglied mit einem für die über den Lichtwellenleiter zu übertragende elektromagnetische Strahlung transparenten Bodenbereich verbunden ist.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß jede Ausnehmung mit mindestens einem Sensor zur Messung eines Reaktionsparameters, insbesondere zur pH-Messung und/oder CO₂-Messung versehen ist oder jeder Ausnehmung mindestens ein solcher Sensor zugeordnet ist.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden mindestens einer Ausnehmung und/oder mindestens eine Ausnehmung so, wie in den Ansprüchen 1 bis 24 beschrieben, ausgebildet ist.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß ein Linsenarray vorgesehen ist, das für jede Ausnehmung mindestens eine Linse aufweist.
29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Ausnehmung eine Linse oder ein Linsenpaar des Linsenarrays zugeordnet ist.
30. Vorrichtung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray eine planparallele Platte aus optisch transparentem Material mit einer Oberseite und einer dieser abgewandten Unterseite aufweist und daß die Linsen auf der Oberseite und/oder der Unterseite der planparallelen Platte angeordnet sind.
31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray von dem Probenträger beabstandet ist.
32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray auf der Oberseite des Probenträgers angeordnet ist.
33. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray eine planparallele Platte aus optisch transparentem Material aufweist, die auf ihrer dem Probenträger abgewandten Oberseite mit Linsen versehen ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray eine planparallele Platte aus optisch transparentem Material aufweist, die auf ihrer dem Probenträger zugewandten Unterseite mit Linsen versehen ist.

35. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Linsenarray eine planparallele Platte aus optisch transparentem Material aufweist, die auf ihrer dem Probenträger abgewandten Oberseite und auf ihrer dem Probenträger zugewandten Unterseite jeweils mit Linsen versehen ist.
36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die optische Achse der einer Ausnehmung zugeordneten Linse oder die optischen Achsen einer Ausnehmung zugeordneten Linsen oder ihre Verlängerungen bzw. Verlängerungen durch die Ausnehmung oder Ausnehmungen hindurch verläuft.
37. Vorrichtung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Linsen des Linsenarrays in den Böden der Ausnehmungen integriert sind.
38. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37 zur parallelen Führung von Reaktionen und/oder Analyse und/oder chromatographischen Trennung großer Anzahlen voneinander unabhängiger Reaktionsansätze mit dem Ziel der vergleichenden Analyse wie Segmentierung und/oder der Kultivierung vermehrungsfähigen biologischen Materials und/oder der chemischen Synthese wie Peptid- und/oder Nucleotid- und/oder Protein-Synthese.
39. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37 zur Festphasensynthetisierung, wobei auf in die Ausnehmungen zur Oberflächenbindung der zu synthetisierenden Substanzen eine Festphase eingebracht wird, insbesondere durch Bestreichen der Oberseite des Probenträgers mittels einer in einer Flüssigkeit aufgeschlämmten Festphase, insbesondere Glasstaub oder Harzpartikel.

40. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37 zur parallelen Sequenzierung von Nukleinsäuren, insbesondere nach dem Verfahren von Sanger, Maxam Gilbert, oder zur parallelen Sequenzierung von Peptiden oder Proteinen.
41. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37 zur Analyse einer extern durchgeführten Sequenzreaktion.
42. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß phänotypische Eigenschaften von Mutanten, die sich jeweils in verschiedenen Ausnehmungen befinden oder dort generiert werden, auf die jeweilige Fitness getestet werden, insbesondere auf spezifische Bindungseigenschaften oder enzymatische Eigenschaften.
43. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß in den einzelnen Ausnehmungen gezielt chemische Synthesen durchgeführt werden, insbesondere die Synthese und/oder chemische Modifikation organischer Moleküle, insbesondere die Synthese von Oligopeptiden oder Oligonukleotiden auf DNA- oder RNA-Basis.
44. Verwendung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die organischen Moleküle biologisch aktive, chemische Leitstrukturen darstellen, die positionsspezifisch in den Kompartimenten mit verschiedenen Substanzen und/oder Substanzgemischen zur Reaktion gebracht werden und die unterschiedlichen Reaktionsprodukte auf bestimmte Eigenschaften analysierbar sind.

- 1 / 18 -

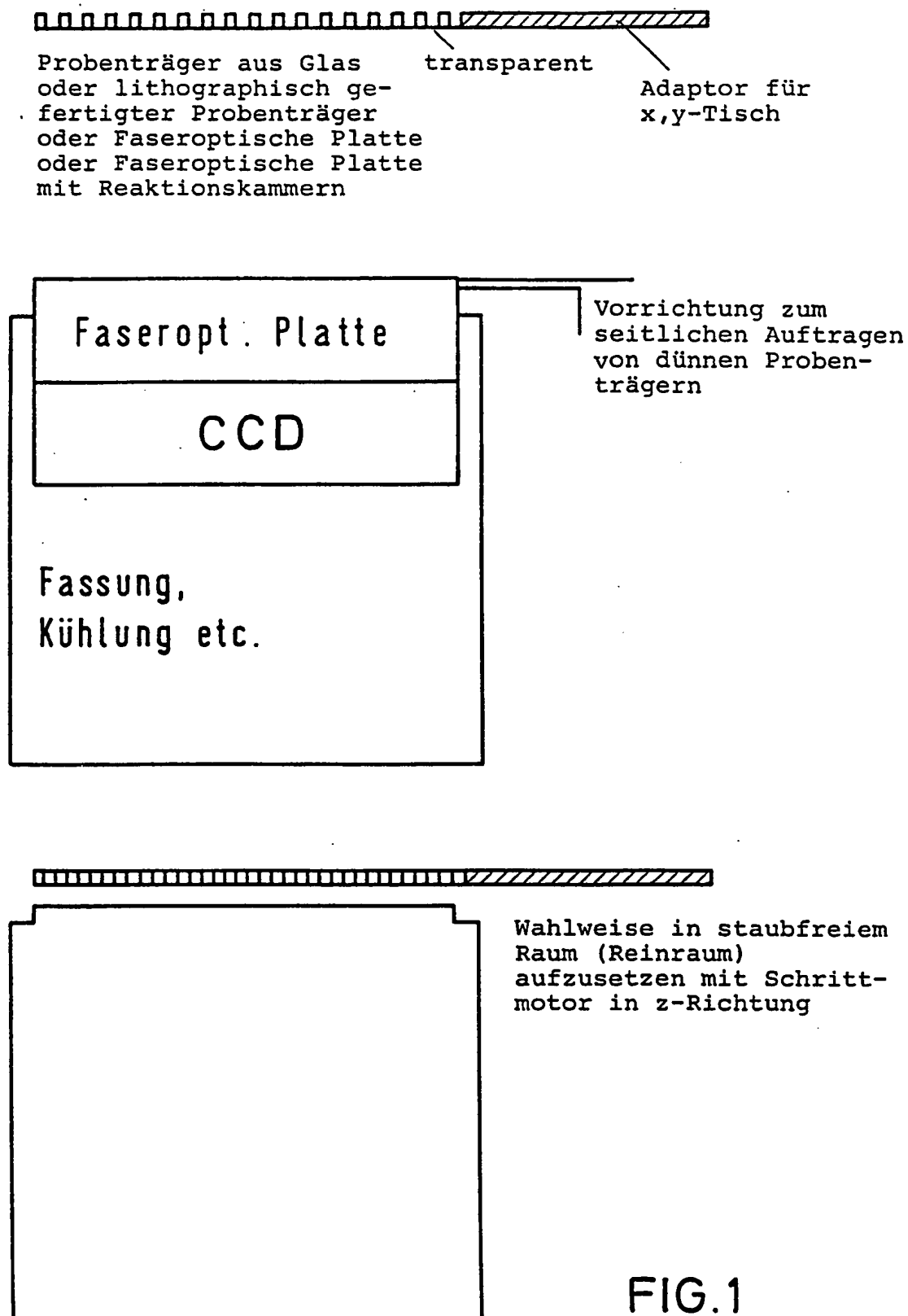


FIG.1

- 2 / 18 -

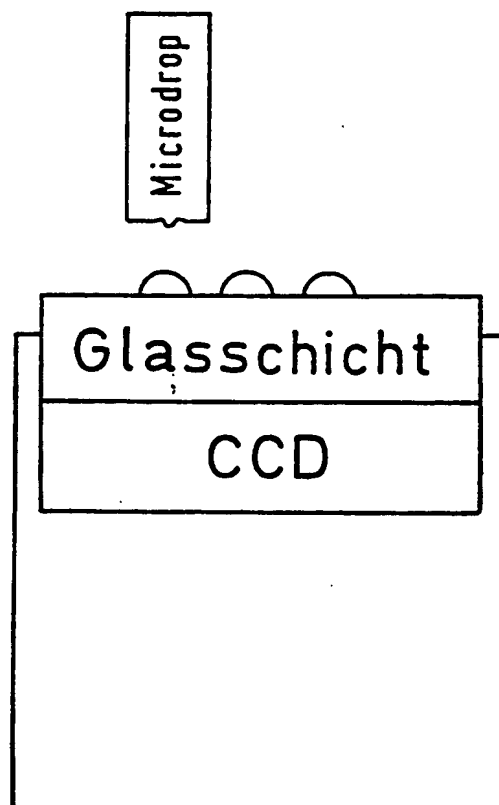


FIG. 2

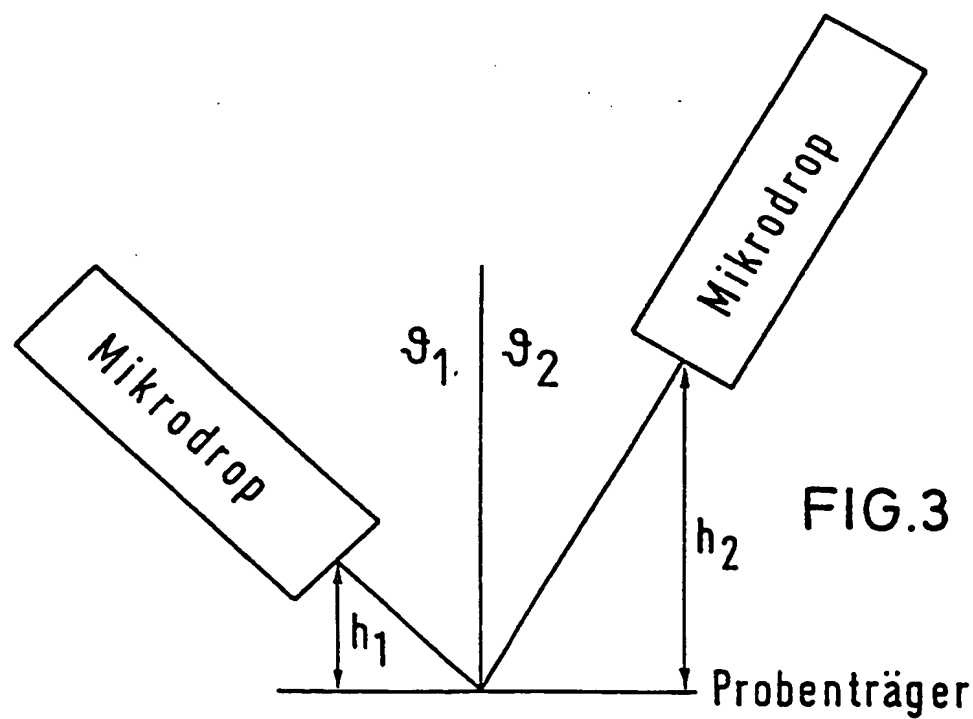


FIG. 3

- 3/18 -

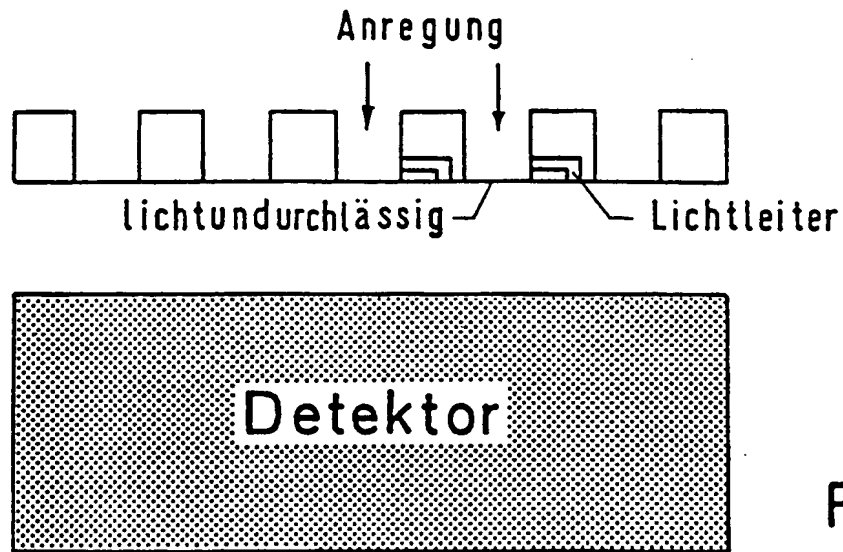


FIG. 4

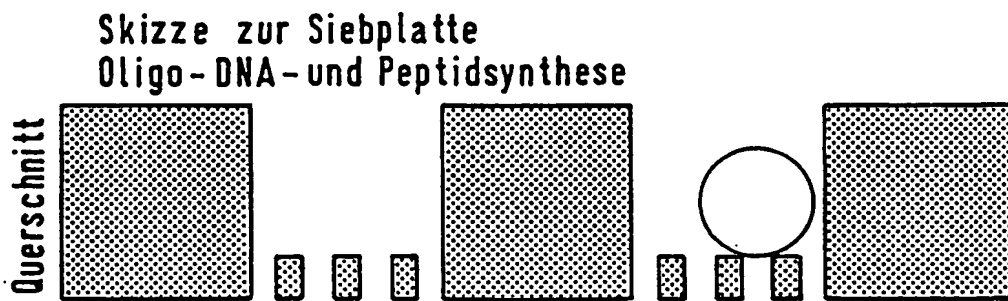
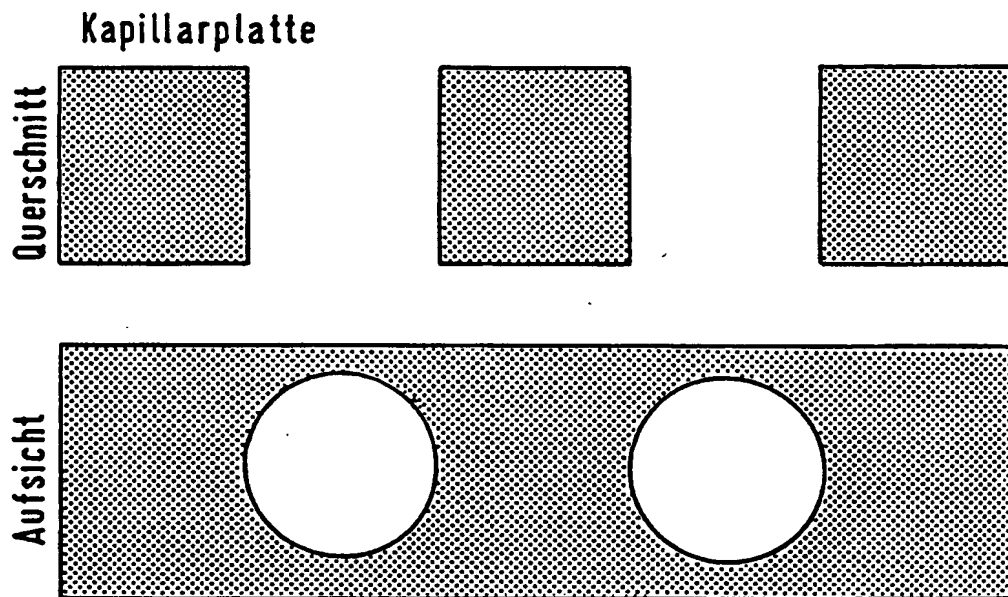


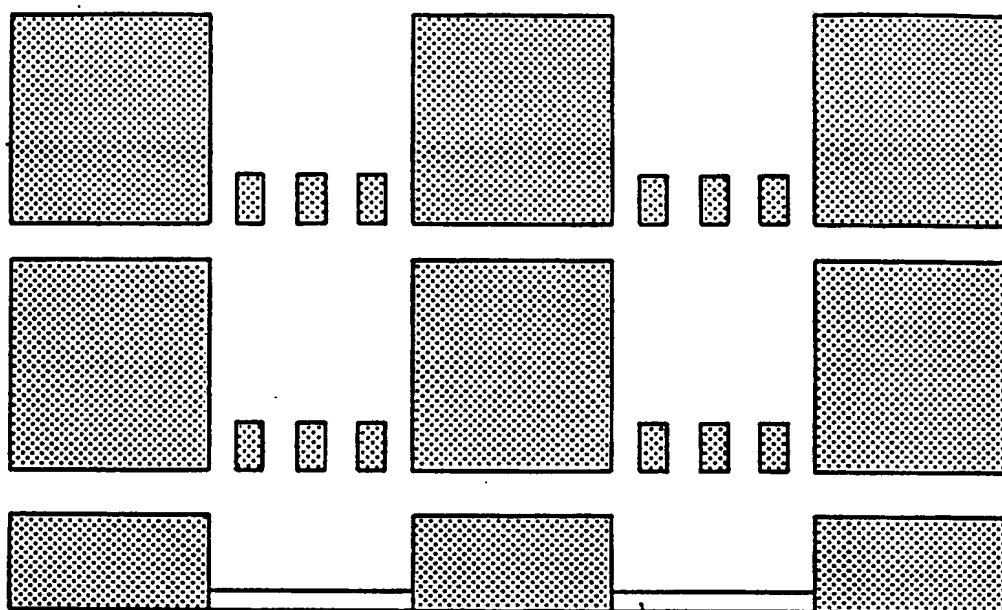
FIG. 5

Glaskugel
(analog Synthesizer)

- 4 / 18 -

Skizze zur Siebplatte

FIG.6



Direkt gekoppelt:
z.B. CCD, Faseroptische Platte

lichtdurchlässig

Draufsicht

FIG.7

Feld 1
(Füllung A)

Feld 2
(Füllung B)

○1	○2	○3	○4	
○5	○6	○7	○8	
○9	○10	○11	○12	
○13	○14	○15	○16	
○1	○2	○3	○4	
○5	○6	○7	○8	
○9	○10	○11	○12	
○13	○14	○15	○16	

1 bis 16 verschiedene Salzkonzentrationen

- 5 / 18 -

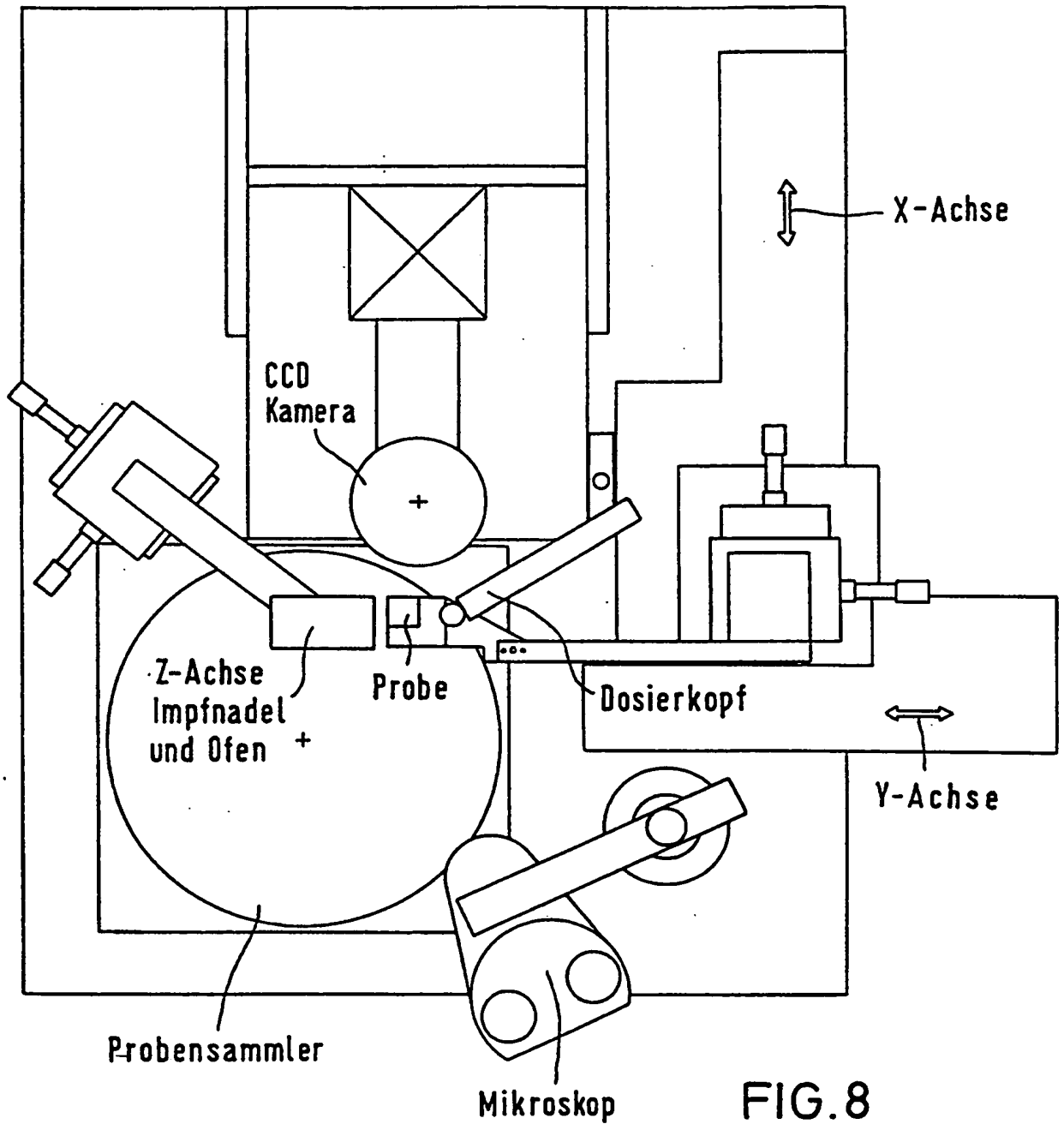


FIG.8

- 6 / 18 -

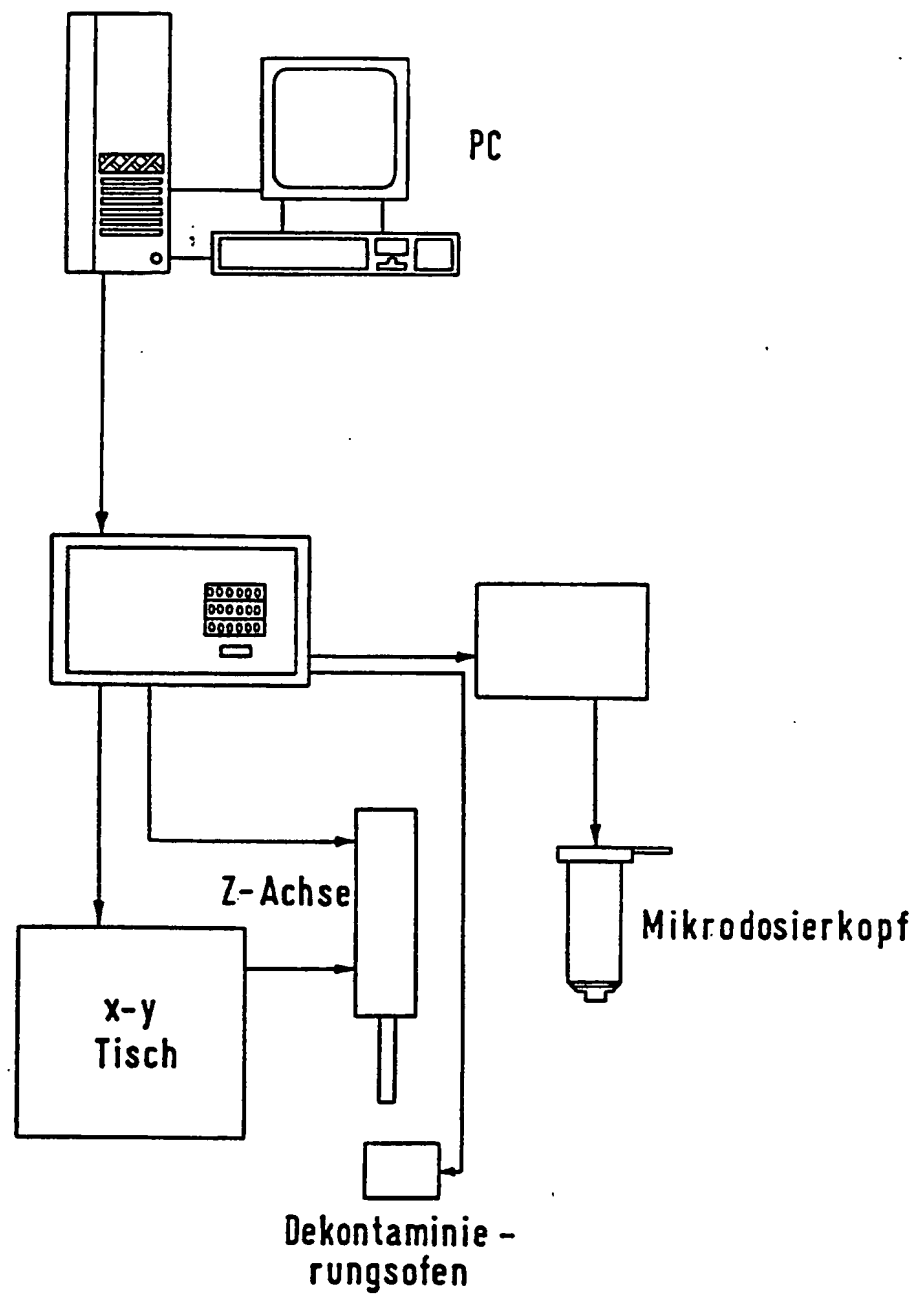


FIG.9

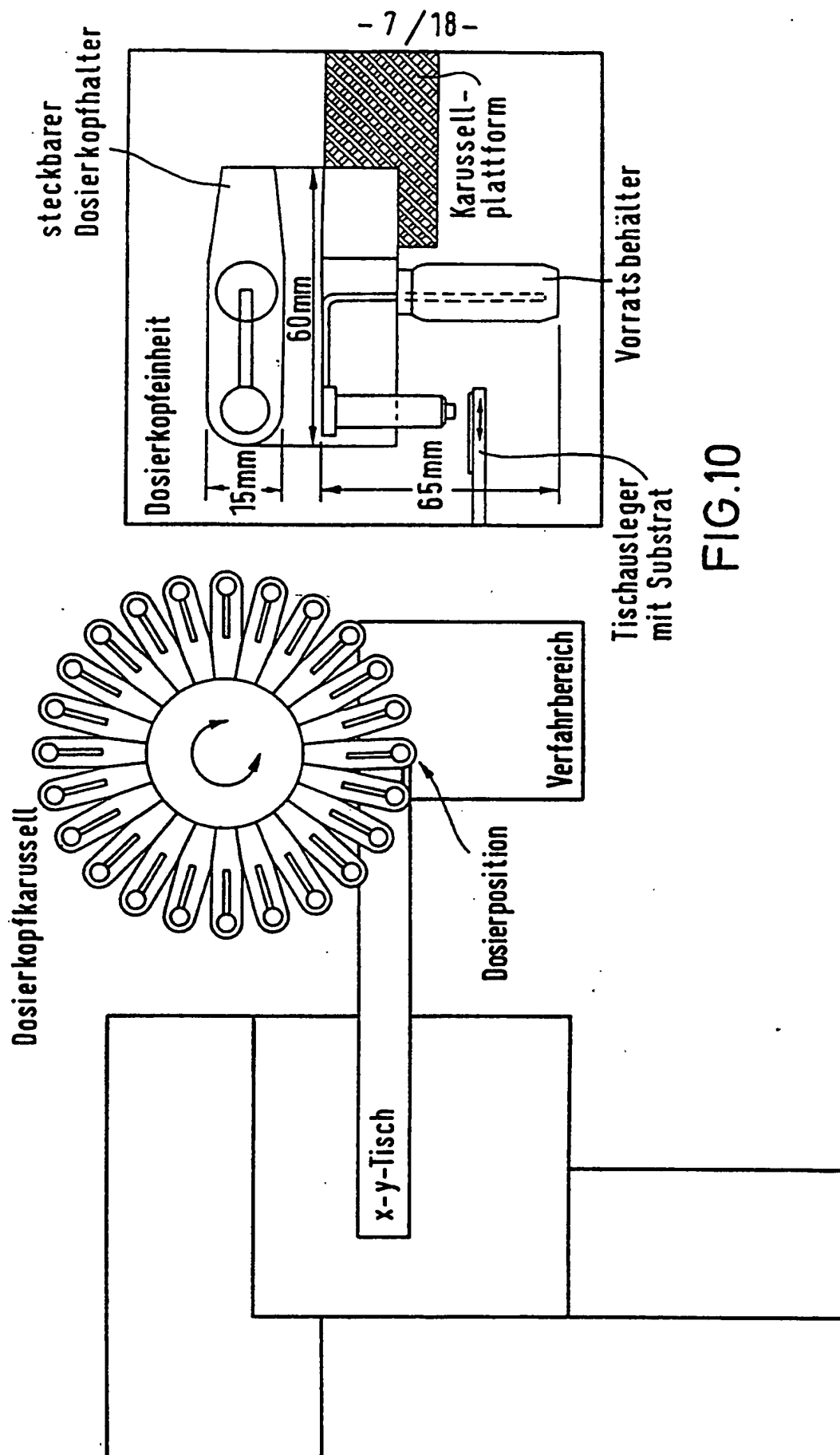


FIG.10

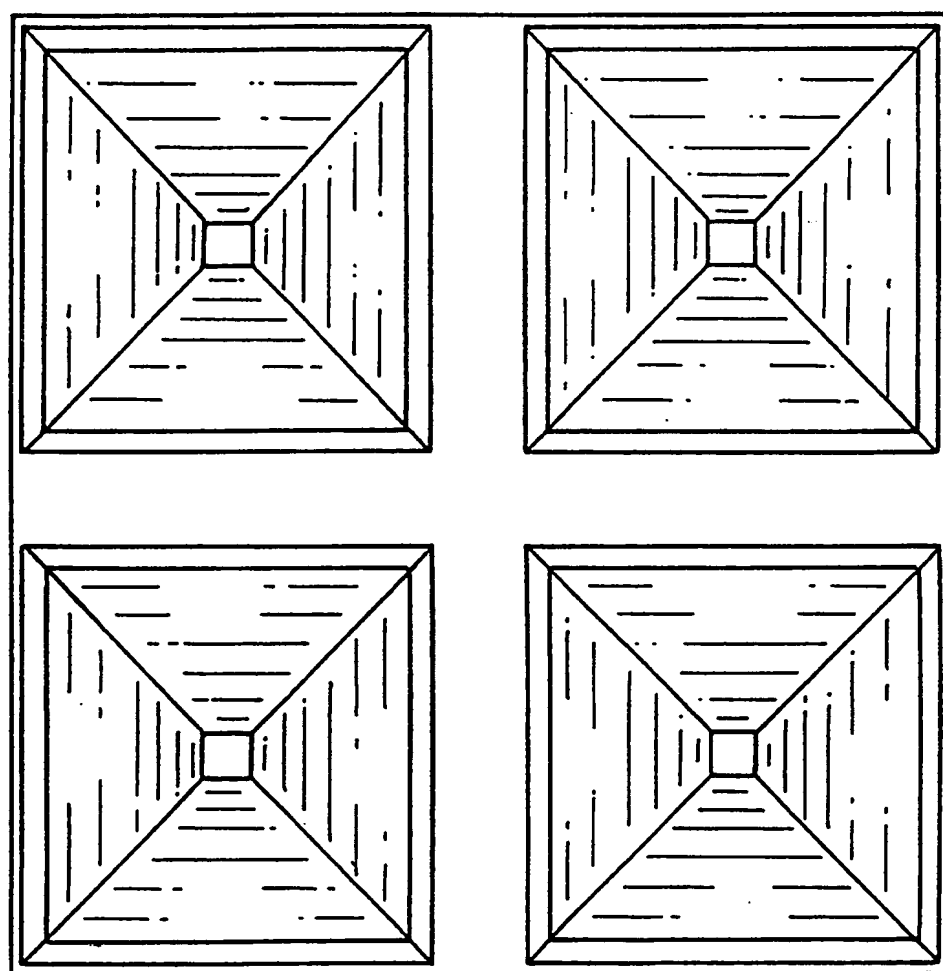
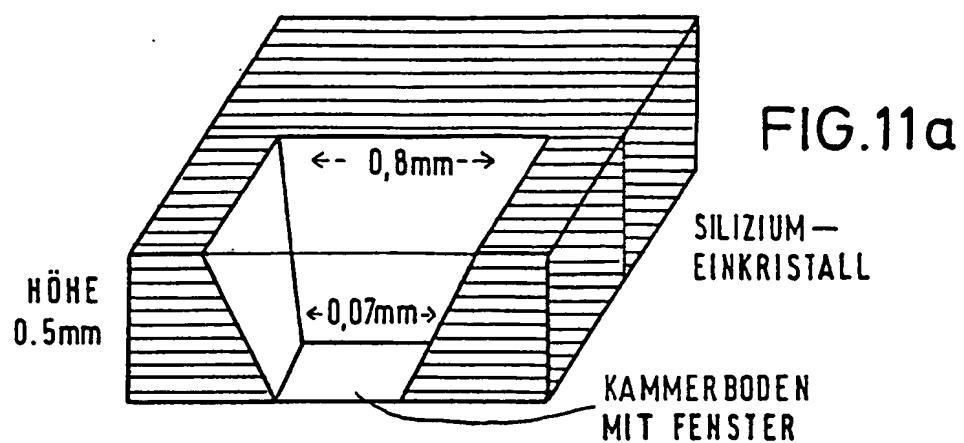
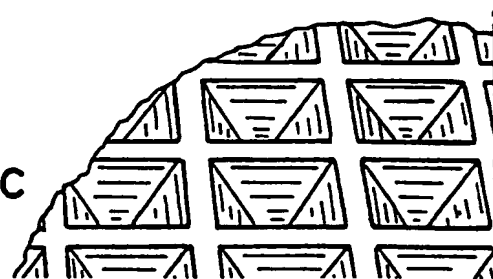


FIG.11c



- 9 / 18 -

Siebböden: Einzelkammer im Anschnitt

FIG.12a

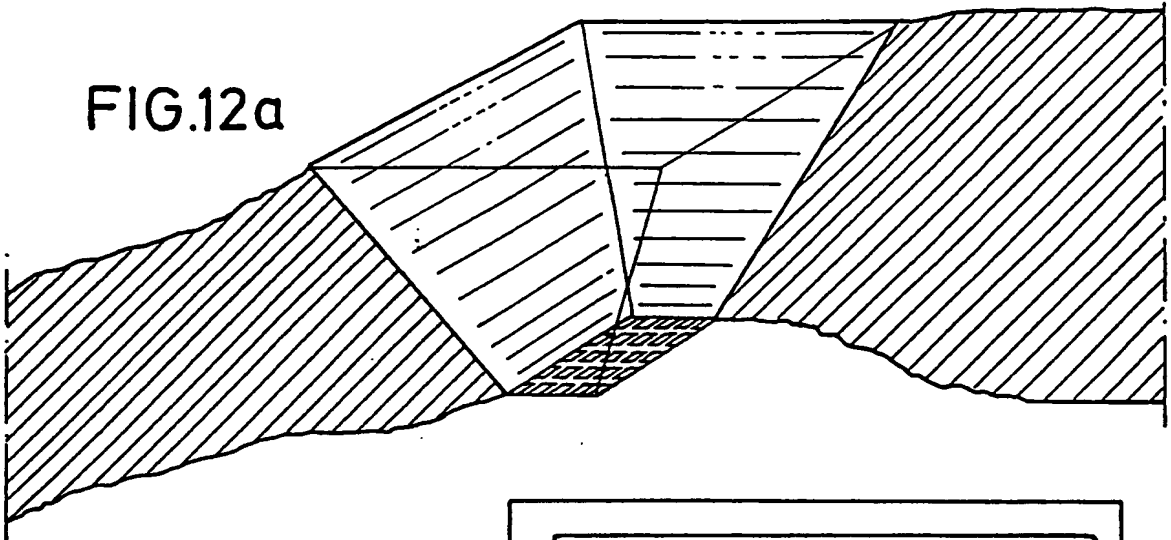


FIG.12b

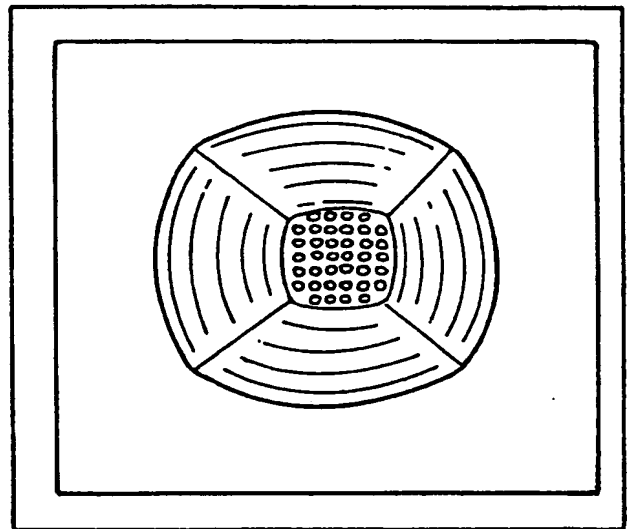
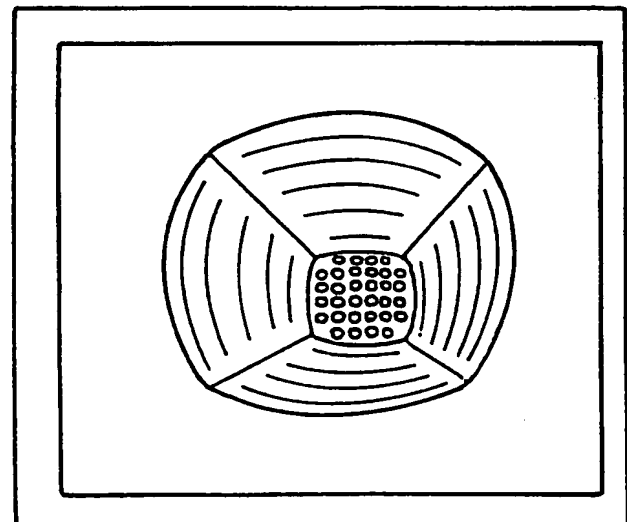


FIG.12c



- 10 / 18 -

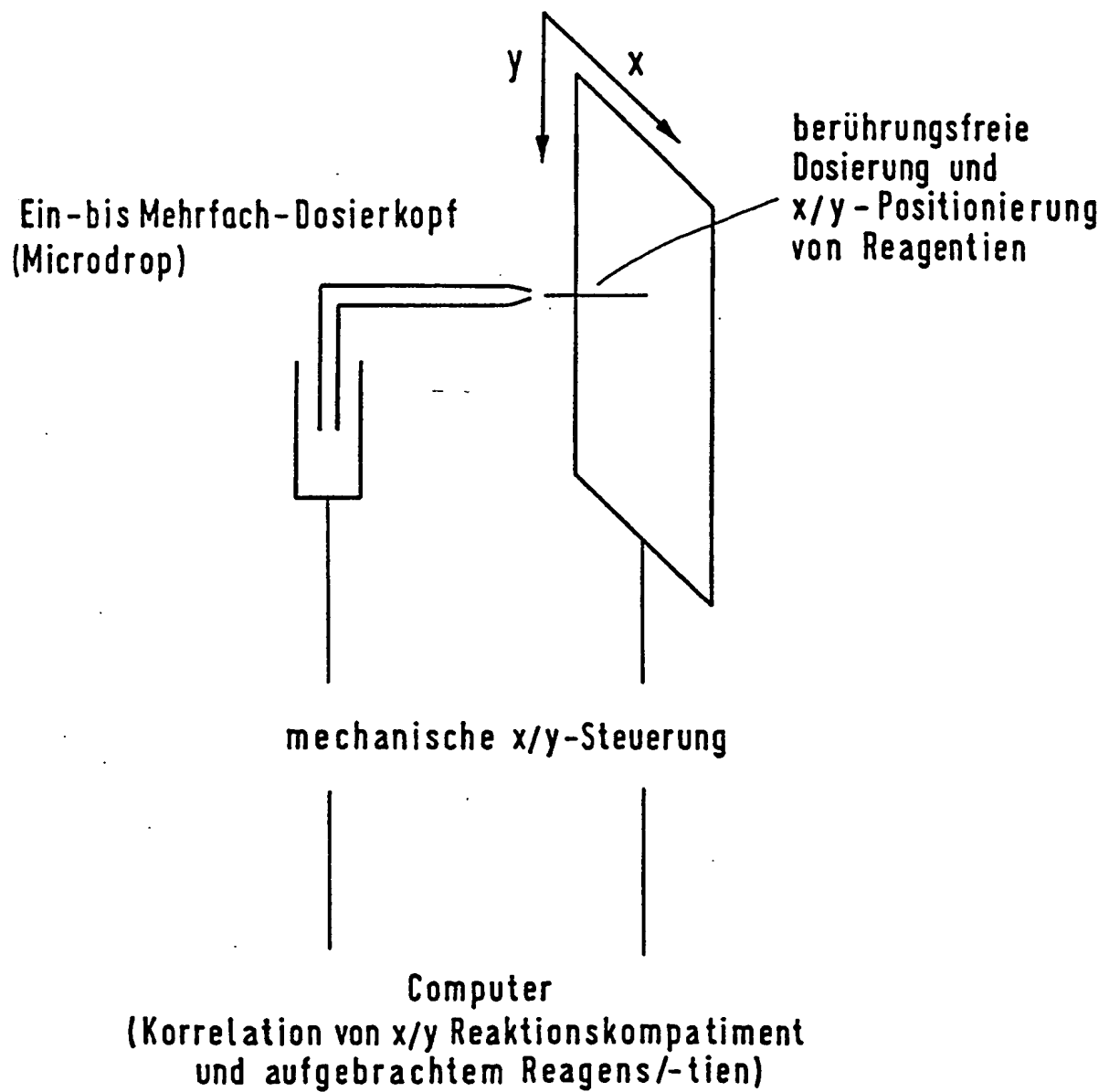
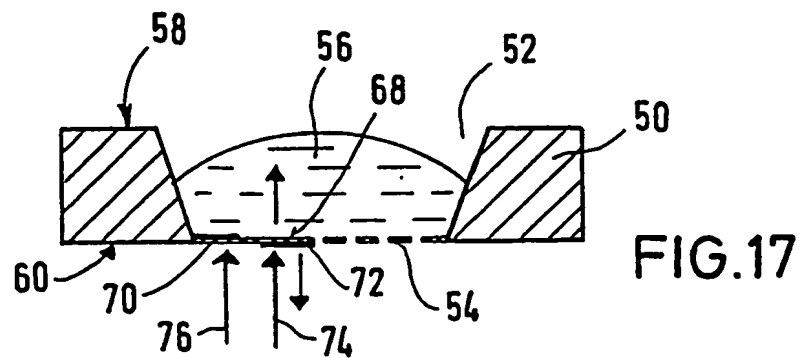
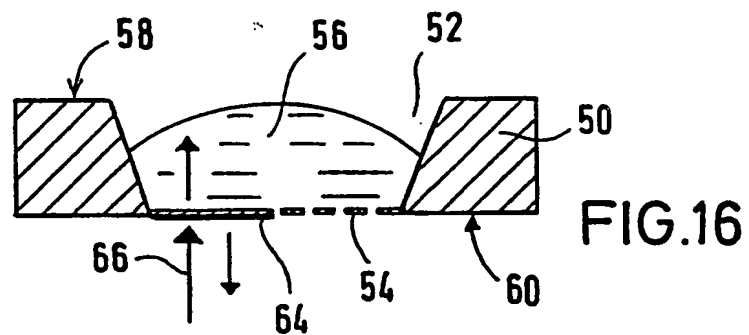
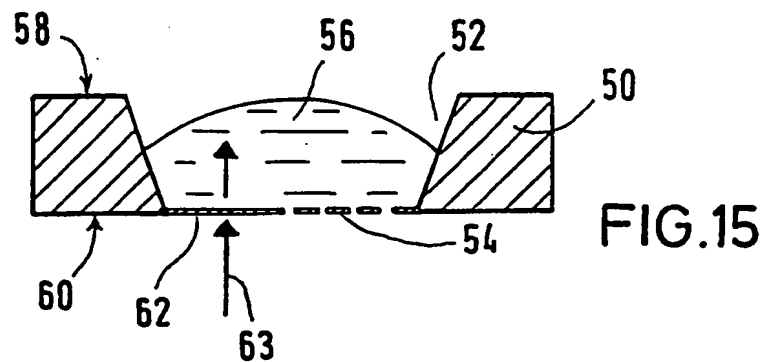
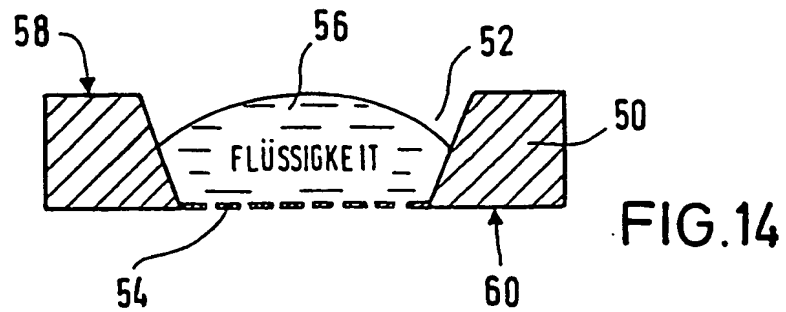


FIG.13

- 11 / 18 -



-12/18-

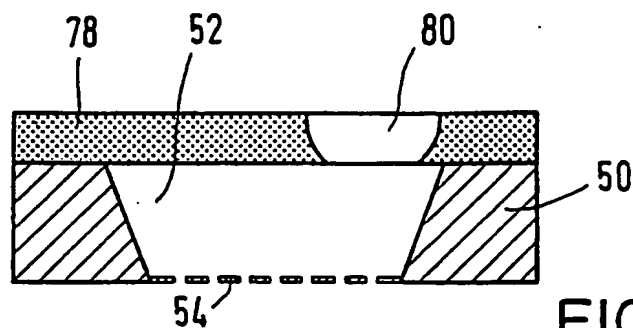


FIG. 18

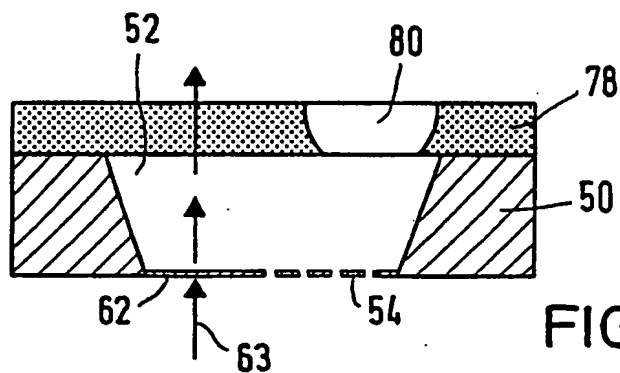


FIG. 19

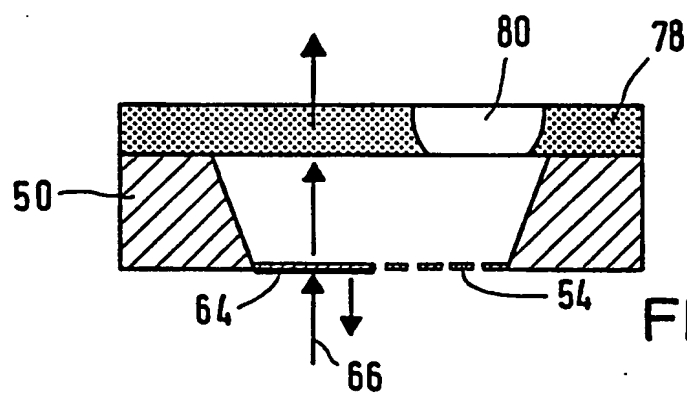


FIG. 20

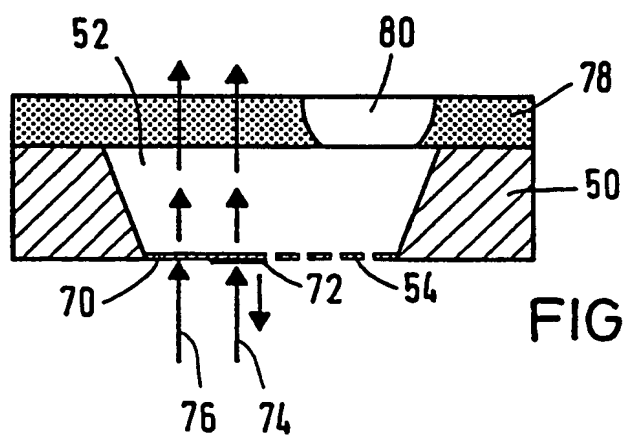
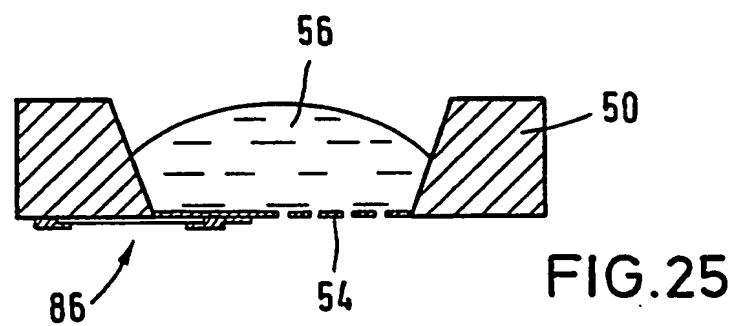
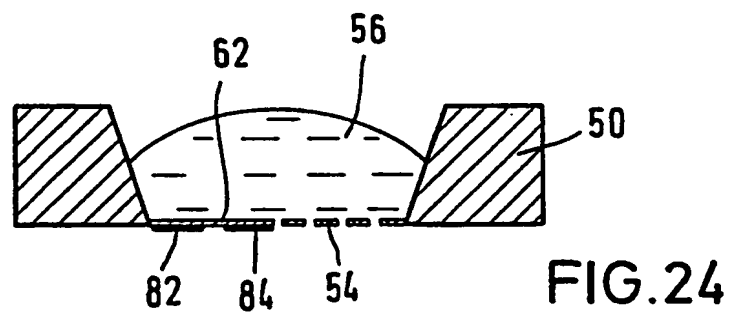
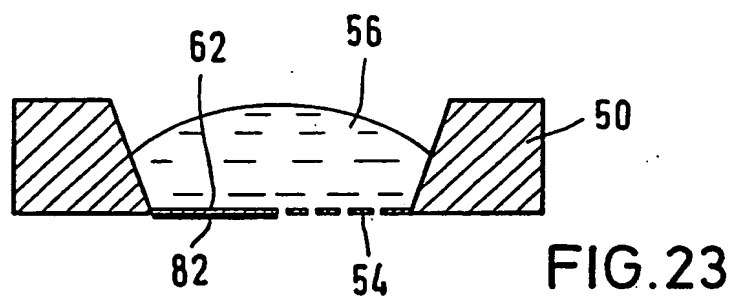
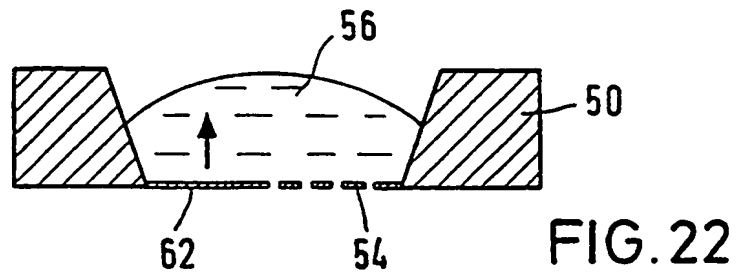


FIG. 21

-13/18-



-14/18-

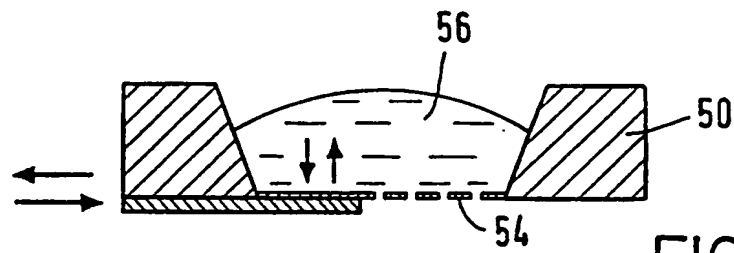


FIG. 26

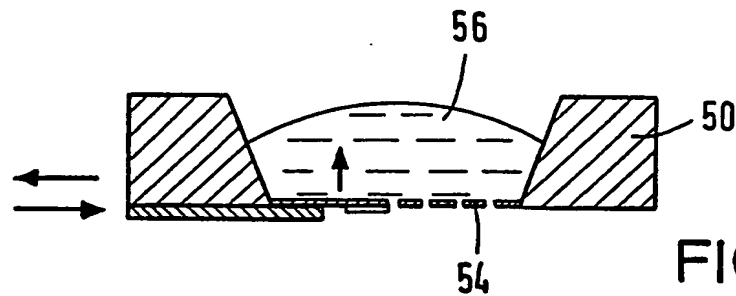


FIG. 27

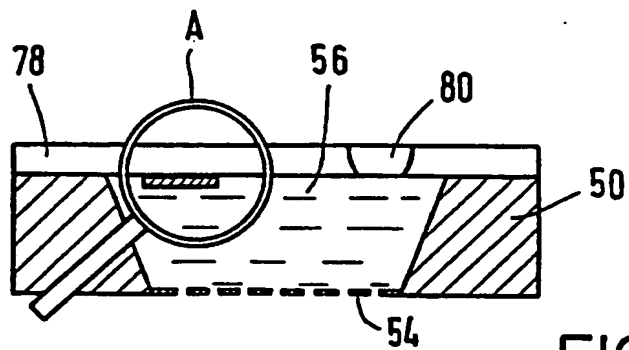


FIG. 28

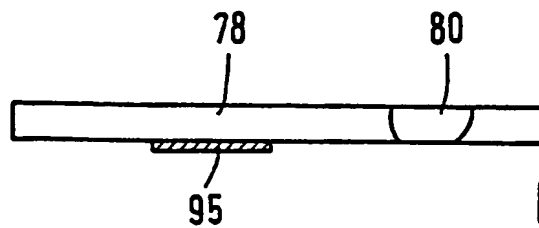
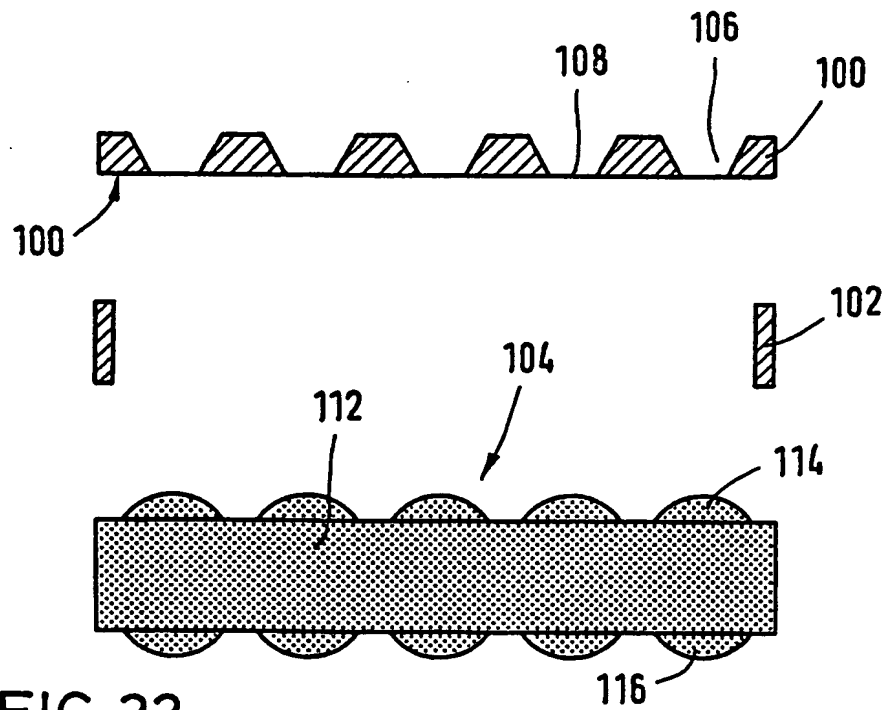
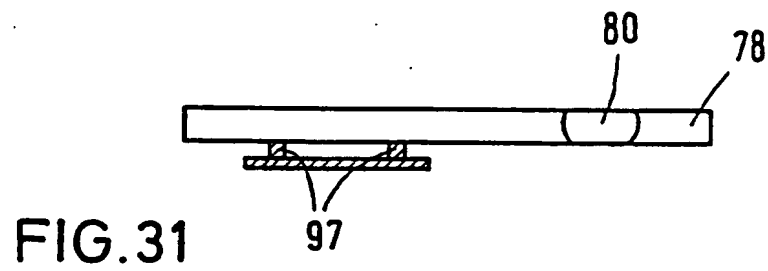
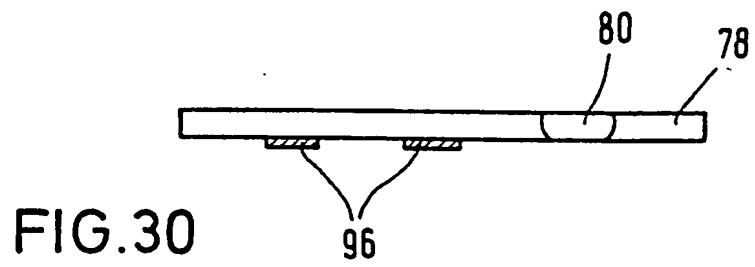


FIG. 29

- 15/18 -



PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



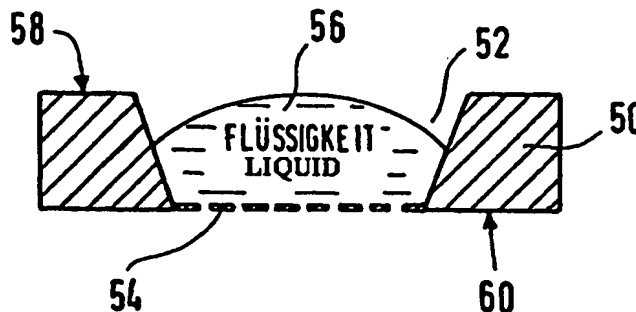
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 1/28, B01L 3/00, B01J 19/00, G01N 30/00, C12Q 1/68</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/01559</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Januar 1995 (12.01.95)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02173</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 1994 (02.07.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 22 147.5 2. Juli 1993 (02.07.93) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529 Hamburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-40699 Erkrath (DE). SCHÖBER, Andreas [DE/DE]; Auf der Lieth 36, D-37077 Göttingen (DE). SCHWIENHORST, Andreas [DE/DE]; Weender Landstrasse 68, D-37075 Göttingen (DE). KÖHLER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 36, D-07743 Jena (DE). THÜRK, Marcel [DE/DE]; Greifswalder Strasse 6, D-37083 Göttingen (DE). GÜNTHER, Rolf [DE/FR]; 11, allée Bernadotte, F-92330 Sceaux (FR). DÖRING, Michael [DE/DE]; Hopfenweg 218, D-22851 Norderstedt (DE).</p> <p>(74) Anwälte: HILLERINGMANN, Jochen usw.; Deichmannhaus, Bahnhofsvorplatz 1, D-50667 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	

(54) Title: **SAMPLE HOLDER AND ITS USE**

(54) Bezeichnung: **PROBENTRÄGER UND SEINE VERWENDUNG**

(57) Abstract

Described is a device designed to hold a multiplicity of chemical and/or biological samples. The device has at least one mechanical micro-sample holder (50) with a lower surface (60) and, remote from it, an upper surface (58), the holder being divided into a multiplicity of recesses (52) with floors, the recesses (52) being produced using non-cutting techniques, in particular by etching. In order to produce apertures extending between the upper and lower surfaces of the sample holder, at least part of the floor (54) of each recess (52) is porous.



(57) Zusammenfassung

Die Vorrichtung zur Aufnahme einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Proben ist mit mindestens einem mikromechanischen Probenträger (50) mit einer Unterseite (60) und einer dieser abgewandten Oberseite (58), in der eine Vielzahl von mit Böden versehenen Ausnehmungen (52) auf nicht-spanende Weise, insbesondere durch Ätzen gebildet sind, versehen. Zur Bildung von sich zwischen der Oberseite und der Unterseite des Probenträgers erstreckenden Durchlässen sind die Böden (54) der Ausnehmungen (52) zumindest teilweise porös.

-17/18-

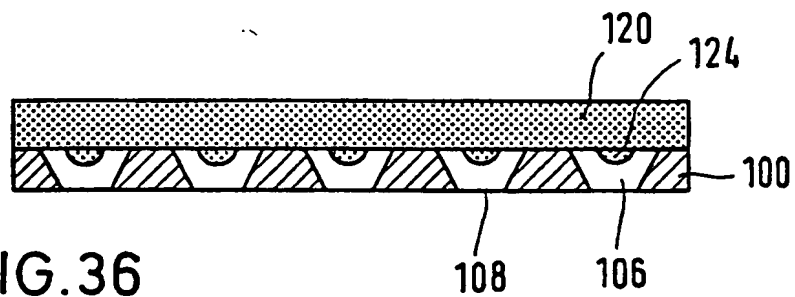


FIG.36

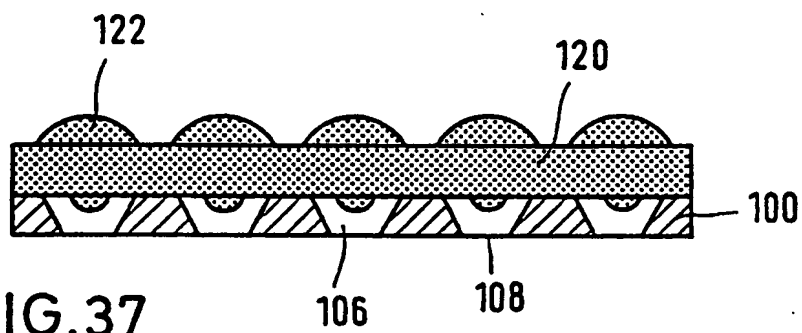


FIG.37

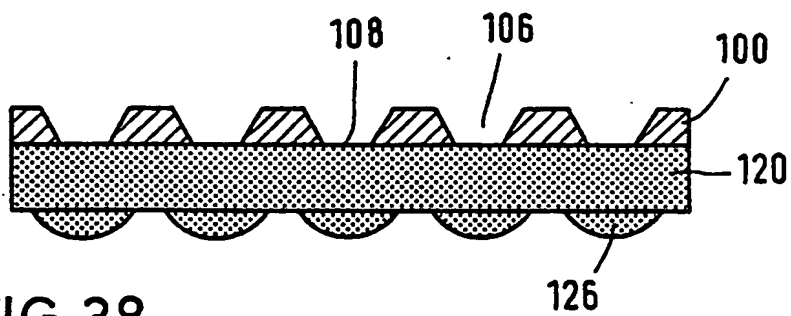
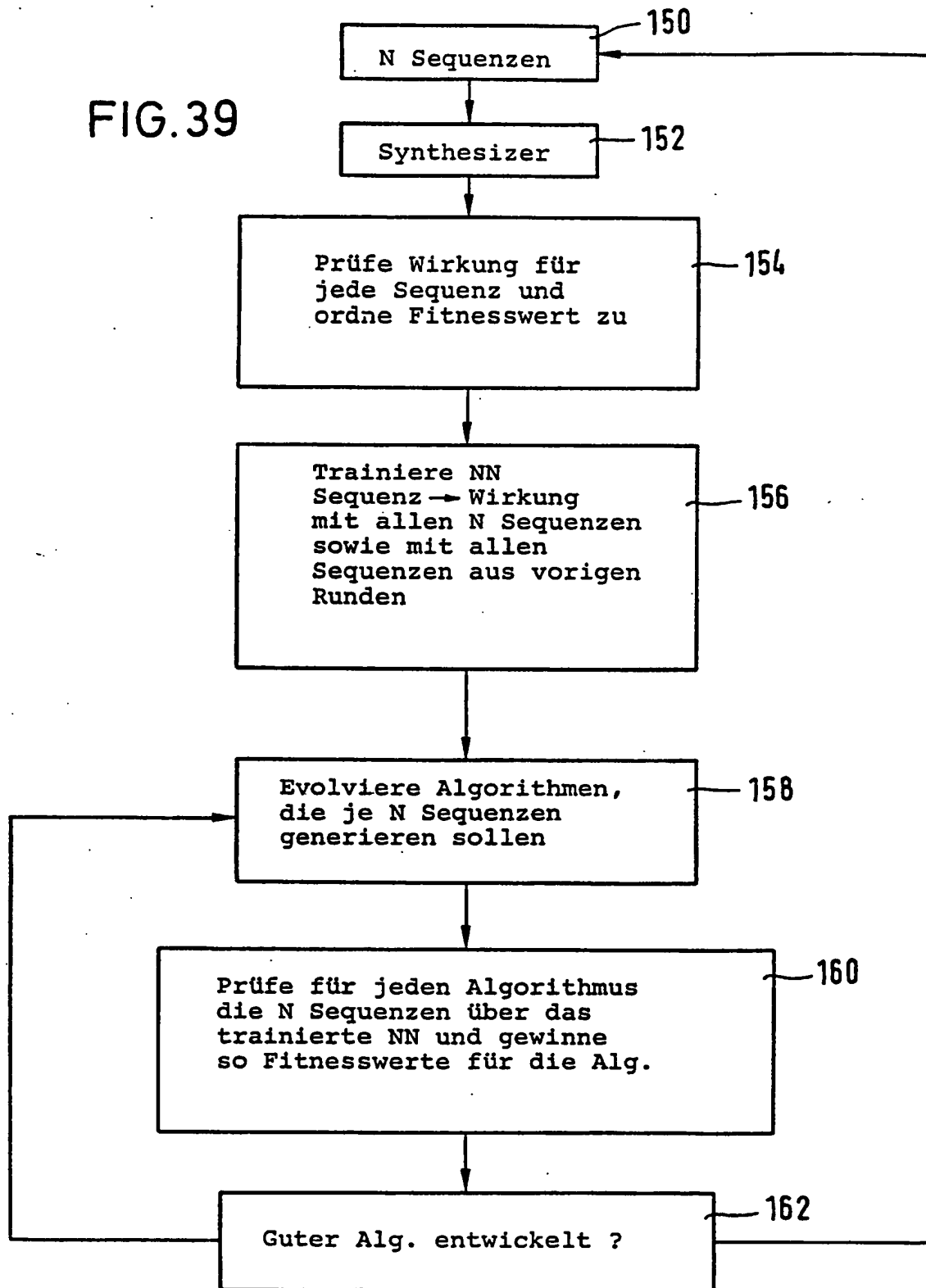


FIG.38

-18/18-

Automatisierte Peptidsynthese

FIG.39



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.